Aix-Marseille

THESE

présentée

à l'UNIVERSITE de PROVENCE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Sciences Physiques)

par

Jean-Claude **MONTET**

ETAT PHYSICO-CHIMIQUE DES LIPIDES DE LA BILE

Soutenue le Février 1972 devant la Commission d'Examen

MM. P. DESNUELLE — Président

R. MERIGOUX, H. SARLES — Examinateurs

THESE

présentée

à l'UNIVERSITE de PROVENCE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Sciences Physiques)

par

Jean-Claude MONTET

ETAT PHYSICO-CHIMIQUE DES LIPIDES DE LA BILE

Soutenue le Février 1972 devant la Commission d'Examen

MM. P. DESNUELLE — Président

R. MERIGOUX, H. SARLES — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Pathologie digestive de l'I.N.S.E.R.M. à Marseille et dans le service de biophysique de l'Institut Pasteur à Paris.

J'adresse mes remerciements respectueux à Monsieur le Professeur P. DESNUELLE pour l'honneur qu'il me fait en présidant cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur R. MERIGOUX qui a bien voulu accepter de juger cette thèse.

J'exprime mes remerciements à Monsieur le Professeur H. SARLES, Directeur de l'Unité de Pathologie digestive pour la confiance qu'il m'a toujours accordée et pour ses encouragements qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur D.G. DERVICHIAN de m'avoir accueilli dans son laboratoire de l'Institut Pasteur où une grande partie de ce travail a été réalisé. Ses conseils m'ont guidé dans l'élaboration de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Docteur J. HAUTON, maître de recherche à l'I.N.S.E.R.M. qui m'a initié à la recherche, et pour l'aide qu'il m'a toujours apportée.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547004_0026

UNIVERSITE DE PROVENCE

U.E.R. SCIENTIFIQUES

Président : F. BOREL

Secrétaire général : C. MOYNAULT

PROFESSEURS

MM. J.	VALENSI	Mécanique expérimentale des fluides
P.	ROUARD	Physique générale
P.	DESNUELLE	Chimie biologique
M.	MERIGOUX	Physique industrielle
C.	FEHRENBACH	Astronomie
A.	FAVRE	Mécanique de l'atmosphère et météorologie
A.	GUILLEMONAT	Chimie industrielle
G.	CARPENI	Chimie
Y.	DOUCET	Méthodes mathématiques de la physique
J.M.	SOURIAU	Méthodes mathématiques de la physique
J.	METZGER	Chimie
L.	FOURES	Mathématiques
D.	MALE	Physique
G.	BODIOU	Mathématiques applisuées
M.	NAUDET	Chimie des corps gras
P.	BOUSQUET	Physique
P.	PESTEIL	Physique
P.	CASAL	Mécanique rationnelle et appliquée
G.	GOUVERNET	Géologie appliquée
A.	VISCONTI	Physique théorique
A.	BLANCHARD	Mathématiques générale

M. DUSSARDIER	Physiologie animale
M. PERROT	Physique
P. QUEZEL	Botanique
E. CRAUSSE	Physique (Avignon)
A. JULG	Chimie théorique
S. TAXY (Mme)	Géologie historique
F. TESSIER	Géologie générale
M.L. FURNESTIN (Mme)	Biologie animale
M. BERTRAND	Chimie
J. TROMPETTE	Physique
M. LAFFITTE	Chimie
R. FRAISSE	Mathématiques
C. BLANCHARD (Mme)	Mathématiques
R. NEGRE	Biologie végétale
R. COULON	Physique
R. KERN	Minéralogie
L. SIDERIADES	Physique
J.M. SURZUR	Chimie organique
H. CHANTREL	Physique de l'espace
J. SOUGY	Géologie
J. HERVE	Electronique
H. BODOT	Chimie
J. CHOUTEAU	Physiologie animale
R. PHILIP	Physique
L. CAPELLA	Minéralogie
P. BILLARD	Mathématiques
M. BONNEAU	Mathématiques
J.C. TRAYNARD	Chimie industrielle
C. CLARION (Mlle)	Mécanique des fluides
A. PONS	Botanique
A. GIRARDIE	Zoologie
J.C. MAIRE	Chimie
M. SIMON	Physiologie animale

J.	MANDELBROJT	Physique
J.P.	DAVID	Physique
M.	BIZOUARD	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

R.	AMAR	Zoologie
L.	DEVEZE	Biologie marine
F.	BOREL	Techniques mathématiques de la physique
R.	CHANDEBOIS (Mlle)	Biologie animale
H.	GUENOCHE	Mathématiques appliquées
F.	PECAUT (Mme)	Mathématiques (Avignon)
J.	HENNEQUIN	Electronique
S.	GUEIRARD (Mlle)	Pétrographie
C.	FEUGEAS	Chimie
J.	CABANE	Chimie
G.	RASIGNI	Physique
S.	COMBET	Chimie
R.	GARRON	Physique expérimentale
M.	CADILHAC	Physique
B.	WAEGELL	Chimie
G.	MARCHIS-MOUREN	Chimie biologique
F.	HALBWACHS	Physique (Avignon)
R.	PETIT	Physique
M.	HUGON	Psycho-physiologie
M.	PICHENOT (Mlle)	Biologie végétale
M.	GILLET	Physique
J.P.	ROGGERO	Chimie (Avignon)
L.	SARDA	Biochimie
C.	ROMAN	Physiologie animale
A.	GILLET	Mathématiques
S.	MARTINUZZI	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

H.	PATIN	Chimie
J.	CRESP	Biologie animale
M.	BENARROCHE	Physique
H.	TACHOIRE	Chimie
E.	VINCENT	Chimie
L.	VICENTE	Biologie animale
J.	MANUCEAU	Mathématiques
R.	GUERMEUR	Physique
M.	DELAAGE	Biochimie
F.	CATZIGRAS (Mlle)	Géologie
M.	SIRUGUE (Mme)	Physique
H.	MERDY	Physique
L.	PUJOL	Chimie
A.	LAVAGNE	Biologie végétale
J.	GIUDICELLI	Biologie animale
M.	FOUGEREAU	Biochimie
G.	NOAT	Physiologie végétale
R.	BOUDET	Mathématiques
R.	STREIFF	Chimie
J.P.	BELAICH	Microbiologie
P.	NEVILLE	Biologie végétale
J.P.	SOUBLIN	Mathématiques
S.	DELACHE (Mme)	Mathématiques
C.	FARDOUX	Chargé d'enseignement - Mathématiques
B.	MORIN	Chargé d'enseignement - Mathématiques
B.	BALLET	Chargé d'enseignement - Mathématiques (Avignon)

SOMMAIRE

Pages

PREMIER CHAPITRE - EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - COMPORTEMENT GENERAL D'UN AMPHIPHILE DANS L'EAU 1

1) Effet de la concentration 1
2) Influence de la température 3
3) Influence de la structure moléculaire 3

II - SYSTEMES BINAIRES LIPIDE-EAU 6

A - Système cholestérol-eau 6
B - Système lécithine-eau 6
C - Système sels biliaires-eau 7

1) Structure moléculaire 9
2) Conjugaison 9
3) Comportement dans l'eau 9
4) Concentration micellaire critique des sels biliaires 10
5) Température micellaire critique des sels biliaires 12
6) Taille et forme des micelles de sels biliaires 12

III - LES ASSOCIATIONS LIPIDIQUES MIXTES 16

A - Associations sels biliaires-cholestérol-eau 16
B - Associations lécithine-cholestérol-eau 17
C - Associations sels biliaires-lécithine-eau 19

1) Phase lamellaire 19
2) Phase cubique 19
3) Phase hexagonale 21
4) Phase micellaire 21

D - Associations sels biliaires-lécithine-cholestérol-eau 23

DEUXIEME CHAPITRE - TECHNIQUES

I - PREPARATION DES PRODUITS 26

A - Purification des sels biliaires 26
B - Purification des lécithines 26
C - Purification du cholestérol 27

II - ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE 28

III - DOSAGE DES SELS BILIAIRES PAR METHODE ENZYMATIQUE 30

IV- DOSAGE DU PHOSPHORE DE LA BILE 30

V - DIFFRACTION DES RAYONS X 32

TROISIEME CHAPITRE - RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - ETUDE DES COMPOSES PHOSPHORES DE LA BILE 35

1) Etude du phosphore minéral des biles humaines 35
2) Etude du phosphore organique 36

A - Matériel et méthode 38
B - Résultats et discussion 40

1) Séparation des phospholipides étalons 40
2) Séparation des phospholipides de la bile humaine 41
3) Purification des lécithines à partir de la bile humaine 44

II - ETUDE DE LA TEXTURE ET DE LA STRUCTURE DE LA LECITHINE BILIAIRE DANS L'EAU 45

1) Texture 45

2) Structure 45

Etude des mélanges lécithine biliaires-eau à différents pourcentage d'eau

a - Etude des grands espacements 45

b - Etude des petits espacements 49

III - INCORPORATION DU CHOLESTEROL DANS LA STRUCTURE LAMELLAIRE DE LA LECITHINE DE BILE HUMAINE

1) Méthodes 50

2) Résultats 50

IV - INFLUENCE DE LA NATURE DES LECITHINES ET DES SELS BILIAIRES SUR LA SOLUBILISATION MICELLAIRE DU CHOLESTEROL

1) Préparation des mélanges 52

2) Résultats 53

3) Discussion 54

CONCLUSIONS 58

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 60

Premier chapitre

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - COMPORTEMENT GENERAL D'UN AMPHIPHILE DANS L'EAU

UNE MOLECULE AMPHIPHILE possède à la fois des parties polaires et non polaires. (1). Les détergents, les savons, les monoglycérides, les lécithines constituent des exemples classiques de molécules amphiphiles.

Les groupements polaires peuvent être les fonctions carboxyliques ionisées, les groupes phosphates, les groupes alcool, ester, aldehyde, et amine. La partie hydrophobe est souvent une longue chaîne paraffinique ou un noyau aromatique. On distingue des amphiphiles non ioniques (partiehydrophile constituée de un ou de plusieurs OH) et des amphiphiles ioniques (anioniques COO^- ou SO_3^- ou cationiques).

Ces molécules amphiphiles possèdent en commun certaines propriétés caractéristiques. Toutes ces molécules peuvent s'orienter. Elles s'adsorbent à l'interface d'une phase aqueuse et d'une phase organique, leur groupe polaire plongeant dans l'eau et leur partie hydrophobe située hors de l'eau ; situation énergétiquement favorable. Elles forment ainsi des couches monomoléculaires orientées.

LE COMPORTEMENT D'UN AMPHIPHILE DANS L'EAU DEPEND ESSENTIELLEMENT :

- de la CONCENTRATION
- de la TEMPERATURE
- de la STRUCTURE MOLECULAIRE

1) - EFFET DE LA CONCENTRATION

Examinons le comportement d'un savon placé dans l'eau et faisons varier

sa concentration.

- Aux grandes dilutions, les molécules sont dispersées individuellement (solution idéale), une partie d'entre elles va constituer une monocouche à l'interface eau-air. Un équilibre s'établit entre les molécules en surface et celles dissoutes dans l'eau. Puisque ces molécules possèdent une partie hydrophobe importante, leur solubilité dans l'eau à l'état isolé est faible.

- Pour réaliser des concentrations plus grandes, les molécules s'agrègent en micelles à partir d'une concentration donnée. Dans ces agrégats, les chaînes paraffiniques sont dissimulées à l'intérieur et les groupements polaires des molécules au contact de l'eau. Cette concentration de saturation en molécules libres est la Concentration Micellaire Critique (C M C). Les molécules formant les micelles et les molécules libres contenues dans la solution sont en équilibre dynamique (temps d'échange : 10^{-3} seconde). Les solutions micellaires sont monodisperses, c'est à dire que les micelles ont toutes la même taille. La concentration des molécules non associées reste constante ou croit très légèrement au dessus de la C M C.

- A des concentrations plus fortes en agents de surface, apparaissent des agrégats plus importants de structure hexagonale. La phase hexagonale est constituée par des cylindres lipidiques de longueur indéfinie disposés au sein de l'eau en symétrie hexagonale.

- A des concentrations encore plus fortes se forment des agrégats lamellaires. La structure lamellaire correspond à un empilement de feuillets plans indéfinis et équidistants. C'est la phase dite "lisse" des savons.

Il existe aussi d'autres types d'arrangements (exemple : cubique). Les arrangements hexagonaux, cubiques et lamellaires ont à la fois des caractéristiques liquides et cristallines. Ils sont appelés liquide - cristallin.

2) - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

L'influence de la température sur les solutions d'amphiphiles permet de mettre en évidence une autre pròpriété qui leur est spécifique.

Les agents de surface ont une faible solubilité à basse température mais au delà de certaine valeur Tc dite température de Krafft, (2) leur solubilité crôit rapidement. Ainsi, du stéarate de sodium placé à 20° C. dans l'eau ne se dissout pas, il se présente sous la forme d'une suspension de cristaux. Mais entre 69° et 71° C. le savon est dispersé sous forme d'une solution micellaire optiquement claire. La solubilité qui était de 0,02 % avant 69° C passe dans un intervalle de température de 2° C. à 20 %.

Cette très forte discontinuité ne saurait être expliquée par une simple augmentation de la solubilité par élévation de température. Ce phénomène ressemble à un changement d'état de la substance.

En effet, il y a fusion des chaînes hydrocarbonées. En même temps, c'est une véritable dissolution. L'eau pénètre dans le réseau du savon en se localisant en couches entre les extrémités ioniques des molécules. Par l'action conjuguée de l'eau et de la température il y a simultanément gonflement du réseau et fusion des chaînes grasses des molécules. Les clichés de diffraction de rayons X mettent en évidence ce passage des chaînes à l'état liquide. Les raies des espacements latéraux se confondent en une bande floue dont l'espacement est voisin de 4,5 Å.

3 - INFLUENCE DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE

La solubilité d'un lipide est gouvernée par la balance hydrophile-lipophile. Ainsi, la trioléine qui possède 3 chaînes hydrocarbonées et qui n'a pas de groupement fortement hydrophile est insoluble dans l'eau. La lysolécithine qui n'a qu'une chaîne grasse et un groupement très hydrophile donne une solution micellaire. Entre les deux, la lécithine avec 2 chaînes grasses et le groupement phosphoryl - choline ne se dissout pas, mais gonfle dans l'eau en donnant un cristal liquide.

PARMI LES MOLECULES AMPHIPHILES, NOUS TROUVONS CERTAINS LIPIDES IMPORTANTS DU POINT DE VUE BIOLOGIQUE ; C'EST LE CAS DES SELS BILIAIRES, DES LECITHINES ET DU CHOLESTEROL.

CES 3 TYPES DE MOLECULES CONSTITUENT LA PLUS GRANDE PARTIE DES LIPIDES CONTENUS DANS LA BILE.

La bile est à l'état normal un liquide clair, isotrope. La composition moyenne d'une bile vésiculaire est :

- 84 % d'eau
- 11,5 % de sels biliaires totaux
- 3 % de phospholipides (essentiellement des lécithines)
- 0,5 % de cholestérol libre
- 1 % d'autres constituants :
  ions inorganiques : Na^+, K^+, Cl^-, HCO_3^-, Ca^{++}
  proteines, peptides (3), bilirubine conjuguée, cholestérol estérifié.

Le pH d'une bile vésiculaire est voisin de 7,5.

Des trois lipides majoritaires présents dans le bile, seuls les sels biliaires sont solubles dans l'eau. La lécithine est insoluble dans l'eau mais gonfle et dissout l'eau. Enfin le cholestérol insoluble dans l'eau, ne gonfle pas.

Les mécanismes par lesquels les lipides insolubles sont solubilisés en phase aqueuse présentent un intérêt aussi bien pour le physico-chimiste que pour le biologiste.

La connaissance des associations moléculaires de ces trois composants en phase aqueuse est indispensable à la compréhension d'un problème biologique important : la formation des calculs de cholestérol dans la lithiase biliaire. La formation des calculs biliaires cholestéroliques nécessite tout d'abord une sursaturation de la bile en cholestérol, puis intervient un phénomène d'agglomération de microcristaux de cholestérol en calculs macroscopiques.

Il a été montré que dans l'étape initiale les lécithines et les sels biliaires conditionnent à eux seuls la solubilisation du cholestérol dans la bile ; les autres constituants semblent jouer un rôle mineur.

Le problème des interactions entre lécithines, sels biliaires et cholestérol dans l'eau a fait l'objet d'un certain nombre de travaux récents.
Le Professeur D.G. DERVICHIAN, D. SMALL et M. BOURGES ont contribué largement à la compréhension des associations lipidiques en phase aqueuse.

II - SYSTEMES BINAIRES LIPIDES-EAU

A - SYSTEME CHOLESTEROL - EAU

Le cholestérol est pratiquement insoluble dans l'eau. Sa solubilité dans l'eau à 20° C = 0,06 à 0,07 mg / L (4). Elle est à peine supérieure à 37° C.

Le cholestérol peut s'étaler à la surface de l'eau pour donner une monocouche très stable qui peut subir une série de compressions et de décompressions sans que le corps ne se dissolve dans le substrat. Son groupe OH plonge dans l'eau (fig 1).

B - SYSTEME LECITHINE - EAU

La lécithine est un constituant de grande importance biologique. La presque totalité (95 %) des phospholipides biliaires (5) est constituée de phosphatidyl - cholines. Il y a en fait un mélange de plusieurs lécithines dont les chaînes grasses sont de nature différente, la longueur de ces chaînes variant de C 14 à C 20.

La lécithine est insoluble dans l'eau quelle que soient les proportions d'eau et de lécithine, mais elle gonfle dans l'eau en donnant des phases paracristallines.

A des températures élevées, supérieures à 90° C et à de très faibles concentrations en eau, la lécithine extraite du jaune d'oeuf donne un phase cubique.

A des températures inférieures et à des pourcentages d'eau plus grands, la lécithine donne une phase lamellaire.

La structure lamellaire est constituée par la superposition de feuillets

bimoléculaires de lipides séparés par des couches d'eau. Les groupements hydrophiles (phosphorylcholine) des molécules sont au contact de l'eau.

La phase lamellaire est homogène, translucide, assez fluide et anisotrope en lumière polarisée. Au microscope la phase se présente comme un savon "lisse" : homogène en lumière directe, nombreuses coniques focales et bords des gouttes de Grandjean en lumière polarisée. Si la phase est assez fluide il peut apparaître le phénomène d'homéotropie : les couches se disposent spontanément les unes sur les autres et l'anisotropie du système disparaît. L'analyse par diffraction aux rayons X donne les espacements caractéristiques d'une structure lamellaire. (D, $\frac{D}{2}$, $\frac{D}{3}$, $\frac{D}{4}$).

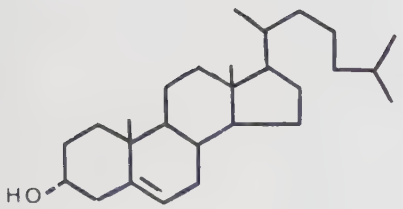
A des pourcentages d'eau supérieurs à 45 % le mélange devient trouble. On a deux phases en présence, la phase paracristalline contenant 45 % d'eau et l'eau pure.

La balance hydrophile - lipophile de la lécithine est telle que contrairement aux savons, dans un excès d'eau, elle ne se dissout pas mais flotte dans l'excès d'eau sous la forme de gouttelettes anisotropes et de figures myéliniques.

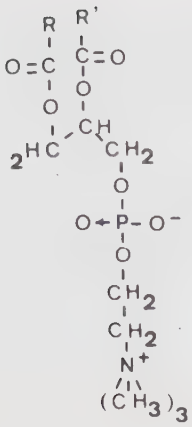
Au moyen des ultra sons (6), ce système peut être agité et la phase paracristalline se résoud en une multitude de gouttelettes microscopiques. On a dispersion dans l'excès d'eau d'une phase composée de 45 % d'eau et de 55 % de lécithine. Ces petits agrégats ne sont pas des micelles car la concentration des molécules libres dans le liquide est négligeable (pas de C M C) et il n'existe pas d'échange de molécules entre les agrégats. La lécithine déposée à la surface de l'eau s'étale en formant une couche monomoléculaire stable (fig 1).

C - SYSTEME SELS BILIAIRES-EAU

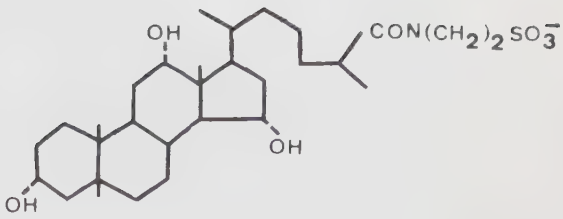
Les sels biliaires sont des agents de surface anioniques.



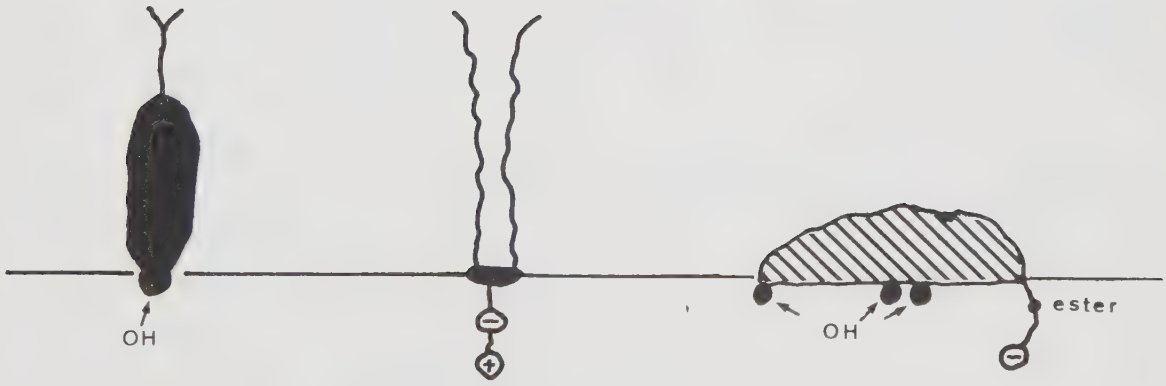
cholestérol



lécithine



sel biliaire conjugué



Comportement à l'interface air_eau

FIGURE : 1

1 - STRUCTURE MOLECULAIRE

Leurs structure moléculaire est assez particulière (fig. 1). Les sels biliaires possèdent un noyau rigide cyclo-pentano-phénanthréne dont les cycles A et B sont situés en position Cis (série normale, hydrogène 5 β). Un côté de ce corps est hydrophobe et contient 2 groupements méthyl, l'autre côté est hydrophile et contient, selon les acides biliaires considérés, 1, 2 ou 3 groupements hydroxyles. Une courte chaîne latérale se branche sur le noyau stéroidique, elle se termine par un groupement carboxylique fortement hydrophile.

2 - CONJUGAISON

Les acides biliaires libres sont conjugués avec la taurine ou la glycine dans la cellule hépatique. Chez l'homme, on trouve à la fois les formes tauro et glyco-conjuguées des acides biliaires primaires choliques (3 α , 7 α , 12 α OH) et chenodesoxy-choliques (3 α , 7 α OH) et de l'acide biliaire secondaire desoxycholique (3 α , 12 α OH)

Des acides biliaires libres se trouvent seulement à l'état de traces (7)
Le rapport $\frac{\text{Glycine}}{\text{Taurine}}$ est variable ainsi que le rapport acides biliaires $\frac{\text{TriOH}}{\text{DiOH}}$.
$\frac{G}{T}$ est en général peu différent de 3.

La conjugaison a pour effet d'abaisser le pKa, et d'accroitre la polarité de la chaine latérale.

3 - COMPORTEMENT DANS L'EAU

En phase aqueuse les sels biliaires, libres ou conjugués, ont des propriétés qui leur sont communes. Ils sont solubles dans l'eau et existent sous forme de molécules isolées en solution très diluée. Ce sont des agents de surface. Ils s'étalent à la surface de l'eau pour donner une monocouche (fig. 1). Les acides biliaires di OH et

tri OH s'étalent horizontalement sur un support aqueux acide, les groupements OH plongeant dans l'eau. Les sels biliaires donnent une monocouche instable qui fait diminuer la tension superficielle de l'eau. A des concentrations plus élevées, les sels biliaires comme les molécules de détergents classiques forment des micelles.

4 - CONCENTRATION MICELLAIRE CRITIQUE DES SELS BILIAIRES

La transformation d'une solution idéale en une solution micellaire entraine un changement brutal de la plupart des propriétés physico-chimiques d'une solution aqueuse d'agents de surface. Cette transition intervient dans un domaine étroit de concentration.

Il existe de nombreuses méthodes physiques qui permettent de déterminer la Concentration Micellaire Critique.

Les plus utilisées sont les suivantes :

a - TENSION SUPERFICIELLE

La tension superficielle de l'eau est nettement abaissée par l'ajout de sels biliaires. Une partie des molécules d'amphiphiles va se disposer à l'interface eau-air, une partie va se dissoudre dans la masse. Quand la surface est saturée , la tension superficielle demeure pratiquement constante. La concentration à laquelle correspond la saturation de la couche est très proche de la C M C du sel biliaire considéré.

b - DIFFUSION DE LA LUMIERE

Lorsqu'une particule est atteinte par un faisceau lumineux, elle réemet dans toutes les directions, sous forme lumineuse, une partie de l'énergie ainsi reçue. L'intensité de la lumière diffusée par les molécules en solution est proportionnelle à leur masse moléculaire. Le passage d'une solution moléculaire à une solution micellaire est donc facile à suivre par cette technique.

c - MODIFICATIONS SPECTRALES DE SUBSTANCES COLOREES

Le spectre d'absorption de certains colorants dans des solutions aqueuses de détergents est modifié de façon très nette lors de la formation des micelles. Cette méthode peut être employée pour la détermination de C M C de sels biliaires. Elle nécessite l'utilisation de colorants de signe opposé à celui porté par la molécule de détergent. Ainsi, la Rhodamine 6 G, la chlorure de pinacyanol (8) et le Methyl orange (9) ont été largement utilisés.

d - SOLUBILISATION DE SUBSTANCES ORGANIQUES HYDROPHOBES

Des colorants insolubles dans l'eau peuvent être solubilisés dans le centre hydrophobe des micelles. On peut suivre l'accroissement de la solubilité de tels colorants par des méthodes optiques. La solubilité croit à partir de la C M C et augmente ensuite avec la concentration en détergent. Cette technique de "dye solubilisation" (1) permet d'apprécier la concentration à laquelle l'agrégation en micelle intervient. Le trans-azobenzène (10) a été très utilisé pour déterminer la C M C des sels biliaires.

Quelques valeurs de C M C à 20° C.

	Dans l'eau	Dans NaCl 0,15 M
Sels biliaires libres tri OH	12 mM	3 à 8 mM
Sels biliaires libres di OH	4 à 6 mM	2 à 4 mM
Taurocholate	2,8 mM	2,7 mM
Taurodesoxycholate	1,5 mM	0,8 mM

La C M C d'un mélange équimoléculaire des sels biliaires tauro-conjugués di OH et tri OH dans Na Cl 0,15 M à 37° C est 1,6 millimoles (11). La C M C à 37° C d'un mélange de sels biliaires analogue à celui présent dans la bile humaine ou dans le contenue intestinal et en présence d'électrolytes à la concentration physiologique, est égale à 2mM (10).

5 - TEMPERATURE MICELLAIRE CRITIQUE DES SELS BILIAIRES

La C M T des sels biliaires conjugués est inférieure à 0° C (12), mais la C M T des sels biliaires mono OH est supérieure à la température du corps. La conjugaison avec la taurine ou avec la glycine n'a pas d'effet sur la C M T.

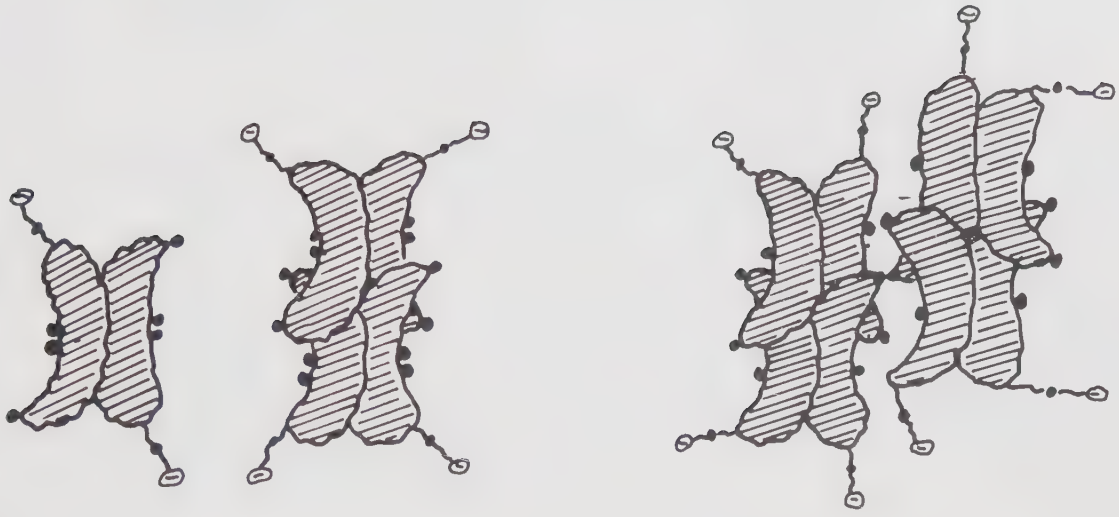
6 - TAILLE ET FORME DES MICELLES DE SELS BILIAIRES

La taille et la forme des micelles de sels biliaires ont été établies par des études de résonance magnétique nucléaire, d'ultra centrifugation à l'équilibre et de diffusion de la lumière (13, 14). L'influence de différents facteurs : température, pH, type de sels biliaires, concentration en counter-ions, a été étudiée. En particulier CORRIN et HARKINS (15) ont montré que la C M C est affectée uniquement par la concentration de l'ion dont la charge est de signe opposé à celui de la charge portée par la micelle. La concentration de l'ion de même signe n'a pas d'influence sur la C M C.

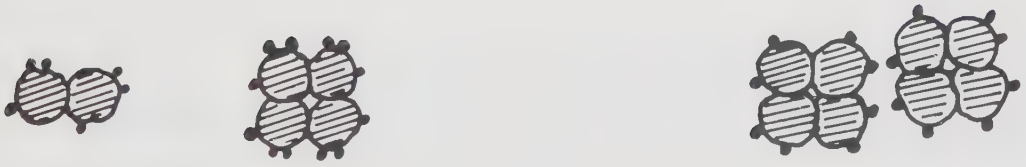
a) DANS L'EAU, les sels biliaires, libres ou conjugués, di OH ou tri OH, forment de petits agrégats micellaires les plus souvent dimères. Ces petites micelles sont dites primaires. A l'intérieur des micelles, les molécules s'associent dos à dos par l'intermédiaire de leur partie hydrocarbonée (association de Van der Waals) tournant leur côté hydrophile vers l'eau (fig. 2). Une telle orientation des molécules les unes par rapport aux autres a été suggérée par leur disposition à l'interface air-eau ou huile-eau. D'autre part, les expériences effectuées avec des modèles d'encombrement ont montré qu'une micelle ne pouvait contenir au maximum que huit molécules de sels biliaires associées dos à dos. Au delà, il y aurait un espace vide au centre de la micelle exposant la partie hydrophobe à l'eau. Des études de résonance magnétique nucléaire (13) ont confirmé ce type d'association. Le mouvement des protons des groupements methyl (C 18) est inhibé lorsque les molécules s'agrègent en micelles ; il y a élargissement des signaux des protons dès que la concentration en sels biliaires dépasse la C M C.

MICELLE PRIMAIRE

MICELLE SECONDAIRE



section longitudinale



section transversale

2 _ 8 ⟵ nombre d'agrégation ⟶ 12 _ 100 +

MICELLES DE SELS BILIAIRES

FIGURE : 2

b - EFFET DES SELS MINERAUX

La concentration en counter-ions influence la C M C et le nombre d'agrégation, et fait apparaître des différences entre sels biliaires dihydroxylés et trihydroxylés.

Les micelles de sels biliaires trihydroxylés sont peu influencées par la concentration en ions de charge opposée à celle portée par la micelle.

Dans l'eau, chaque micelle est formée de deux molécules de sels biliaires, même très au delà de la C M C alors que en présence de Na Cl on peut avoir jusqu'à huit molécules par micelle. A des concentrations en Na Cl supérieures à 3 M les sels biliaires restent toujours en solution.

La C M C est également très peu modifiée par l'ajout de sels minéraux. Ainsi la taurocholate de sodium à 20° C a une C M C égale à 2,8 mM dans l'eau, et de 2,7 mM dans NaCl 0,15 M.

Les sels biliaires dihydroxycholaniques se comportent différemment. Ainsi le glycodesoxycholate en présence de NaCl 0,5 M forme des agrégats beaucoup plus importants ($\overline{Ag}^{\#} = 63$) que ceux qu'il forme dans l'eau ($\overline{Ag}^{\#} = 2$). De plus, à des valeurs en NaCl = 0,8 mM, les sels biliaires dihydroxylés précipitent. Leur C M C est très nettement abaissée en présence de sels. Ainsi la C M C du taurodesoxycholate de sodium est 1,5 mM dans l'eau à 20° C et 0,8 mM dans NaCl 0,15 M.

Ainsi dans le cas des dérivés di OH (desoxy ou chenodesoxy) quand la concentration en NaCl est augmentée le nombre d'agrégation croît et la C M C diminue.

Il y a formation de micelles plus grandes, dites micelles secondaires (fig.2) qui sont des agglomerats de micelles primaires ($12 < \overline{Ag}^{\#} < 100$). Les micelles primaires seraient reliées entre elles par des ponts hydrogène entre deux groupements OH.
Les micelles secondaires ne sont pas asymétriques. Les données de la diffusion de la

lumière et de la viscosité indiquent qu'elles sont presque sphériques.

c - EFFET DU pH

Si l'on abaisse le pH des solutions de sels biliaires trihydroxylés jusqu'à des valeurs voisines du pKa le nombre d'agrégation est inchangé. Dans des conditions identiques les sels biliaires di OH voient leur nombre d'agrégation croître énormément ($\overline{Ag} > 1000$) avec formation d'un gel (liaison H entre le OH en 3 α et le COOH de l'acide biliaire).

d - EFFET DE LA TEMPERATURE

Elle a peu d'effet sur les petites micelles, mais les micelles secondaires de di OH voient leur taille diminuer quand la température croît.

e - CHANGEMENT DE PHASE AVEC LA CONCENTRATION

Les sels biliaires normaux 5 β, libres ou conjugués, ne forment jamais de phases paracristallines. Cette propriété les distingue des détergents classiques.

III - LES ASSOCIATIONS LIPIDIQUES MIXTES

A - ASSOCIATIONS SELS BILIAIRES - CHOLESTEROL - EAU

Les solutions de sels biliaires, libres ou conjugués, sont de pauvres solubilisants du cholestérol. (16). Les solubilités varient selon le type de sels biliaires. D'après Dam (17) pour dissoudre 1 mM de cholestérol, il faut des quantités de sels biliaires variant de 19 à 62 mM (19 mM de glycodesoxycholate ou 30 mM de taurodésoxycholate ou 34 mM de glycochenodesoxycholate ou 47 mM de taurochenodesoxycholate ou 52 mM de glycocholate ou 62 mM de taurocholate). Il faut environ 97 mM du mélange des sels biliaires conjugués, dans les proportions où ils se trouvent dans la bile, pour dissoudre 3 mM de cholestérol.

Le mécanisme réel de solubilisation du cholestérol dans ces solutions de sels biliaires est mal connu. Il a été suggéré par Woodford (18) l'existence de 2 types de micelles :

- une micelle petite ($Ag^{\#} = 5$) faite uniquement de sels biliaires (taurocholate),
- une micelle plus grande ($Ag^{\#} = 26$) qui serait une micelle mixte, contenant une molécule de cholestérol pour 25 molécules de taurocholate.

Le cholestérol en excès apparaît sous forme de cristaux. Il n'y a jamais formation de phase paracristalline.

Les sels biliaires, à eux seuls, ne pourraient dissoudre dans la bile que le tiers du cholestérol qui s'y trouve habituellement. Isakson (50, 51)avait déjà insisté sur le rôle de la lécithine dans la solubilisation du cholestérol en présence de sels biliaires. Il avait montré que les sels biliaires et la lécithine formaient un système soluble dans l'eau et que ce système était capable de dissoudre le cholestérol in vitro.

B - ASSOCIATION LECITHINE - CHOLESTEROL - EAU

On a vu que la lécithine, placée dans l'eau à une température telle que ses chaînes grasses soient liquides, gonfle dans l'eau en donnant une phase para-cristalline de type lamellaire. Des couches bimoléculaires de lécithines liquides alternent avec des couches d'eau, les groupements hydrophiles phosphorylcholine de la lécithine plongeant dans l'eau (fig. 3).

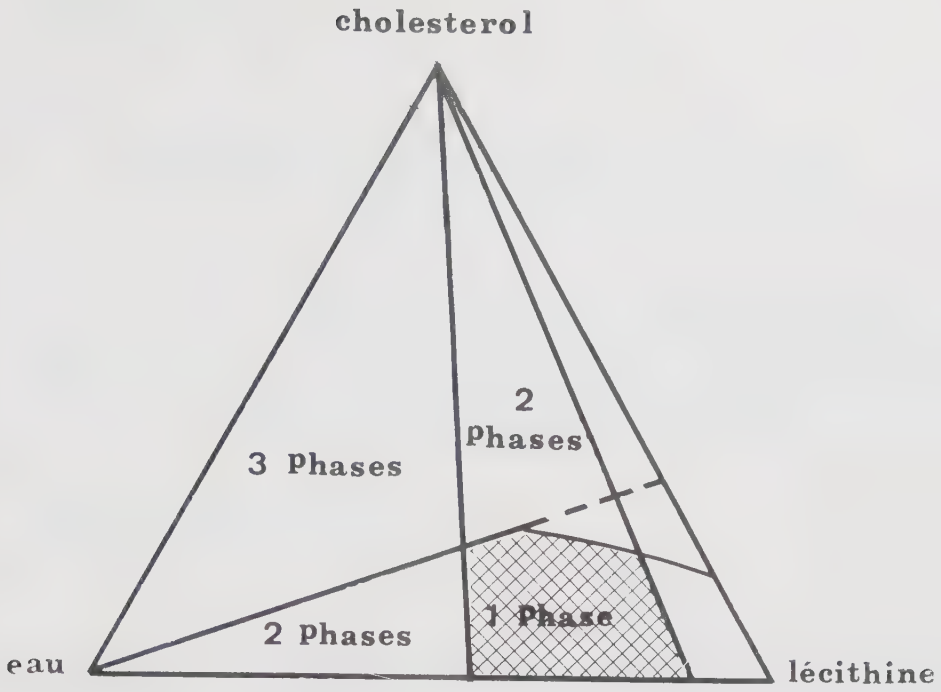
Le comportement des mélanges lécithine - cholestérol dans l'eau (19, 20) est défini par le diagramme de phase ternaire (fig 3).

La lécithine est capable d'incorporer du cholestérol à l'intérieur de la phase lamellaire. Il est possible de solubiliser ainsi une molécule de cholestérol par molécule de lécithine. Si l'on dépasse cette proportion et quel que soit le pourcentage d'eau, le cholestérol cristallise.

Dans les couches lipidiques, les deux constituants lécithine et cholestérol sont vraisemblablement associés en palissade. Plusieurs faits permettent de le penser :
Les études réalisées par de Bernard (21) sur des couches monomoléculaires de mélanges lécithine - cholestérol, montrent que l'aire moyenne par molécule est intermédiaire entre celle de la lécithine seule et celle du cholestérol. Elle est donc inférieure à celle que l'on pourrait attendre par une simple règle d'additivité.
D'autre part, les études aux rayons X sur des mélanges lécithine - cholestérol indiquent aussi une réduction de l'aire moléculaire moyenne et confirment les valeurs trouvées en couches monomoléculaires au maximum de pression (22).

L'association lécithine - cholestérol dans l'eau présente donc une structure palissadique. Les molécules de lécithine et de cholestérol sont placées côte à côte avec leur partie paraffinique tournée vers l'intérieur du feuillet et leur groupe polaire (groupe phosphotidyl choline pour la lécithine et groupe OH pour le cholestérol) vers la couche d'eau adjacente.

Dans le système lécithine - cholestérol - eau, il n'apparaît jamais de



Système ternaire : lécithine - cholesterol - eau

Structure lamellaire $\frac{\text{lécithine}}{\text{cholesterol}} = \frac{\text{1 mole}}{\text{1 mole}}$

FIGURE : 3

phase micellaire.

C - ASSOCIATION SELS BILIAIRES - LECITHINE - EAU

Le diagramme de phase ternaire lécithine - sels biliaires conjugués - eau (23) fait apparaître l'existence de trois phases paracristallines et d'une phase micellaire, selon les proportions des différents constituants (fig. 4).

1) PHASE LAMELLAIRE (zone 1)

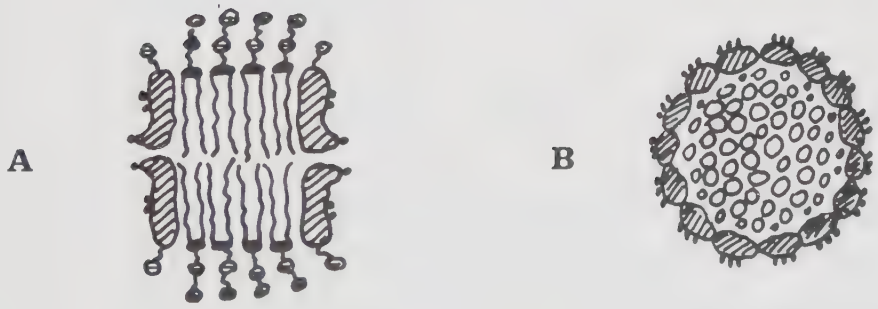
Sa texture est la même que celle rencontrée dans les mélanges lécithine - eau et lécithine - cholestérol - eau. Son aspect est clair, fluide. Sous le microscope, elle présente l'aspect caractéristique des savons lisses (24). Sa structure est similaire à celle décrite plus haut dans le système lécithine - cholestérol - eau. Les études aux rayons X ont pu montrer que dans cette phase les molécules de sels biliaires sont interdigitées sous forme de paires ou de tétramères entre les chaînes grasses des lécithines. Les groupements hydroxyles de chaques molécule de sels biliaires se lient par liaison hydrogène au groupement hydroxyle de la molécule de sel biliaire qui lui fait face. Les sels biliaires présentent ainsi le côté hydrophobe de leur noyau stéroïdique au contact des chaînes paraffiniques des lécithines.

A des concentrations supérieures en sels biliaires apparaissent 2 autres phases mésomorphes.

2) PHASE CUBIQUE (zone 2)

C'est une zone étroite représentant des systèmes contenant entre 22 et 27 % d'eau. Cette phase a un aspect clair, c'est la plus translucide et la plus rigide des phases rencontrées. Elle est isotrope en lumière polarisée.

Système ternaire : lécithine - sels biliaires conjugués - eau



Structure d'une micelle mixte : { lécithine / sels biliaires conjugués

A - coupe longitudinale

B - coupe transversale

FIGURE : 4

Les analyses aux rayons X donnent des espacements correspondants à une structure cubique à faces centrées :

$$1, \frac{\sqrt{3}}{2} , \frac{\sqrt{3}}{8} , \frac{\sqrt{3}}{11} .$$

Une bande diffuse dont l'espacement est voisin de 4,5 Å correspond aux petits espacements.

3) PHASE HEXAGONALE (zone 3)

La texture de cette phase est identique à celle de la "middle soap" décrite par Rosevear (24). Elle est claire, visqueuse et présente un aspect nuageux caractéristique entre nicols croisés. Elle possède une liberté de mouvement dans une seule direction : le long de l'axe des cylindres.

Les espacements obtenus aux rayons X sont caractéristiques d'une structure hexagonale :

$$D, \frac{D}{\sqrt{3}} , \frac{D}{\sqrt{4}} , \frac{D}{\sqrt{7}}$$. Des cylindres très allongés dont les axes sont disposés suivant un arrangement hexogonal seraient faits d'un empilement de disques bimoléculaires de lécithine entourés par des molécules de sels biliaires. La phase médiane est la phase paracristalline dont le pourcentage d'eau peut être le plus élevé. Dans un excés d'eau, ces cylindres se brisent et donnent des micelles mixtes.

4) PHASE MICELLAIRE (zone 4)

C'est une solution parfaitement claire, isotrope. La solution est d'autant plus fluide que le pourcentage d'eau est plus élevé. L'analyse aux rayons X de ces solutions montre une bande diffuse (40 à 80 Å).

La lécithine a une très haute solubilité micellaire dans une solution de sels biliaires. Dans le diagramme de phase (fig. 4) la zone micellaire occupe une surface très importante. Une molécule de sels biliaires peut solubiliser jusqu'à deux molécules de lécithine.

Un modèle de micelle mixte a été proposé par Dervichian et Small (13, 25) à partir de renseignements fournis par l'étude de la structure de la phase hexagonale et par des mesures de viscosité, de diffusion de la lumière et de résonance magnétique nucléaire. Ce modèle (fig 4) est compatible avec les caractéristiques physicochimiques et la structure des molécules de lécithine et de sels biliaires. Les micelles mixtes auraient une forme cylindrique, elles seraient constituées d'un disque bimoléculaire de lécithine, chaque couche étant entourée d'un anneau de molécules de sels biliaires. Les groupements phosphorylcholine sont orientées vers l'eau et les chaînes paraffiniques vers l'intérieur de la micelle. Les molécules de sels biliaires stabilisent la dispersion de la lécithine en présentant leur face hydrophile à l'eau et leur face lipophile en contact avec les chaînes paraffiniques de lécithine et liées par des forces de Van der Waals. Les études de résonance magnétique nucléaire effectuées sur des micelles mixtes contenant des proportions variables de lécithine et de sels biliaires confirment que le sel biliaire est lié hydrophobiquement aux chaînes de la lécithine. En effet, les signaux dus aux groupements méthyl des carbone C_{18} et C_{19} des sels biliaires s'élargissent quand la quantité de lécithine passe de 5 à 40 % en poids ; au dessus de 50 %, aucun pic n'est identifié. Ceci montre que le degré de liberté de ces groupements méthyl est diminué par la présence de la lécithine.

Cette propriété qu'ont les sels biliaires de dissoudre des composés organiques insolubles dans l'eau est caractéristique des solutions de détergents au dessus de leur C M C. C'est le PHENOMENE DE LA SOLUBILISATION (26).

On peut schématiquement distinguer 2 types de solubilisation :

- la solubilisation polaire où les molécules de la substance solubilisée sont elles-mêmes amphiphiles (lécithine, monoglycéride, acides gras). Le groupement polaire du corps solubilisé est tourné vers l'eau. La solubilité observée est ici très importante.

- Des lipides non polaires (exemple : le Transazobenzène) peuvent également être solubilisés dans le coeur hydrocarboné liquide de la micelle. La solubilité micellaire de ces solutés est relativement faible.

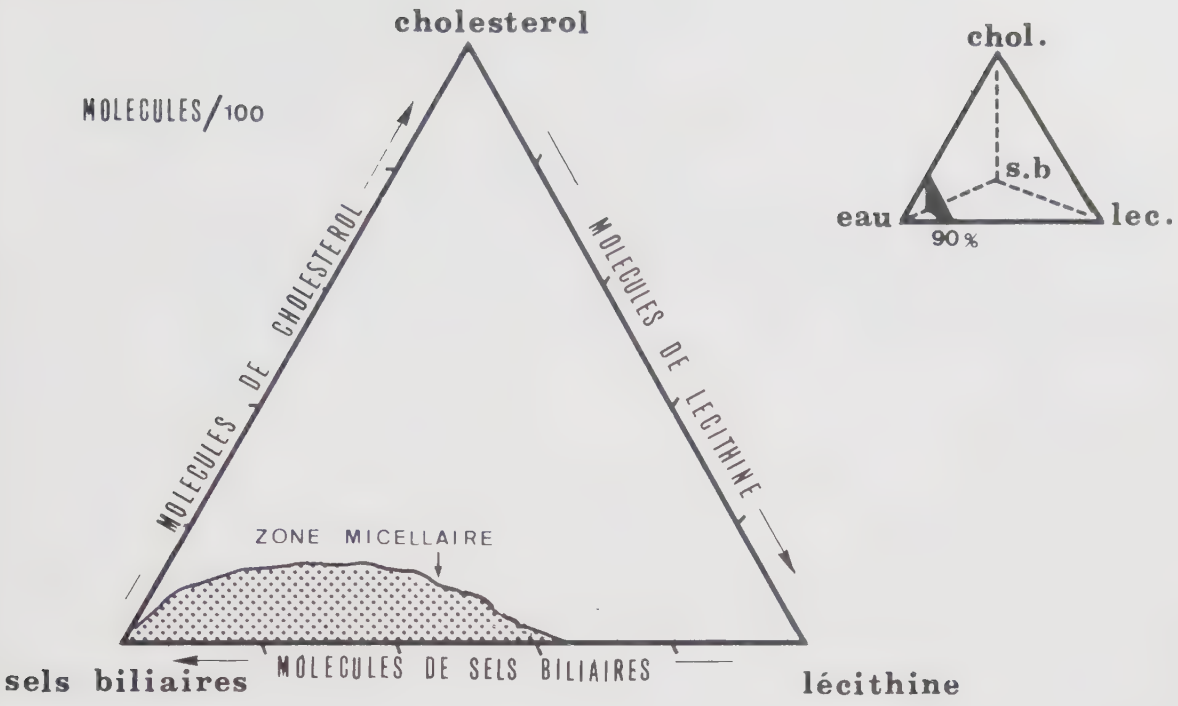
D - ASSOCIATIONS : SELS BILIAIRES - LECITHINE - CHOLESTEROL - EAU

Ce système à 4 constituants (16) est représenté graphiquement par un tétraèdre régulier dont chaque sommet correspond à un constituant pur (fig. 5). Le diagramme de phase ternaire lécithine - sels biliaires - eau étant établi, il a été possible d'ajouter des quantités croissantes de cholestérol à chacun de ces mélanges. C'est ainsi que 25 % de cholestérol sont incorporés dans la phase lamellaire, 6 % dans la phase cubique, 6 % dans la phase hexagonale et 4 % dans la phase micellaire. Ce mode de représentation à 4 variables est toutefois difficile à manipuler. Sachant que la bile vésiculaire contient une proportion d'eau à peut près constante (80 %), il est préférable d'étudier une section de ce tétraèdre parallèle au triangle de base lécithine - sels biliaires - cholestérol et à un pourcentage d'eau correspondant à celui de la bile. Sur ce diagramme ternaire (fig. 5) apparaît ainsi le contour d'une zone micellaire (27). Dans cette zone se trouve une phase homogène à l'intérieur de laquelle des quantités relativement importantes de cholestérol peuvent être solubilisées. En dehors de cette zone, le cholestérol en excès est présent sour forme de cristaux ou inclus dans une phase paracristalline. Selon les proportions relatives de lécithine et de sels biliaires on peut avoir 2 ou 3 phases en présence.

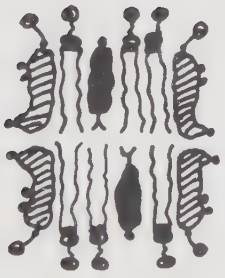
La structure d'une micelle mixte sels biliaires - lécithine - cholestérol est probablement très proche de celle des micelles lécithine - sels biliaires. Les molécules de cholestérol se rangeraient entre les molécules de lécithine comme elles le font dans la phase lamellaire, l'ensemble étant entouré d'un anneau de molécules de sels biliaires (fig. 5).

Le mécanisme de solubilisation du cholestérol en phase aqueuse paraît donc bien compris.

Les sels biliaires seuls ne dissolvent que très peu de cholestérol. Quand



Système quaternaire : cholesterol _ lécithine _ sels biliaires _ eau . } à 90% d'eau



Structure d'une micelle mixte:

lécithine _ cholesterol _ sels biliaires conjugués

FIGURE : 5

la micelle de sels biliaires est gonflée par la lécithine la présence d'une région hydrocarbonée liquide permet de solubiliser des quantités beaucoup plus importantes de cholestérol.

Hofmann (réf. 12) a suggéré que le cholestérol est à l'état dissous dans la bile grâce à son incorporation dans des micelles mixtes ternaires. Des études d'ultracentrifugation et de diffusion de la lumière ont démontré l'existence de tels agrégats dans la bile.

Deuxième chapitre

TECHNIQUES

I - PREPARATION DES PRODUITS

Nous avons été amené à purifier des quantités importantes de sels biliaires et de phospholipides à partir de la bile.

A - PURIFICATION DES SELS BILIAIRES

De la bile est mélangée avec du charbon végétal en poudre (produit Prolabo R P) puis évaporée à l'étude. Le résidu sec est pulvérisé puis épuisé par l'éthanol absolu (mélange porté à ébullition pendant 3 heures). Les extraits sont filtrés et concentrés. Le liquide obtenu très visqueux est précipité par de l'oxyde d'éthyle anhydre. Le mélange est lavé plusieur fois puis séché sous vide en présence de $P_2 O_5$. Les analyses faites par chromatographie en phase gazeuse ou sur couche mince ainsi que l'analyse du phosphore montrent la pureté des sels biliaires obtenus. (absence de cholestérol, d'acides gras, de phosphore...). Les sels biliaires sont conservés secs à l'abri de la lumière ou mis en solution dans du méthanol anhydre.

Nous avons extrait les mélanges de sels biliaires à partir de bile humaine et de bile de boeuf. La proportion des différents acides biliaires a été déterminée par chromatographie gaz liquide et par chromatographie sur plaque suivie d'une analyse par la technique enzymatique (3 α hydroxystéroïde déshydrogénase).

B - PURIFICATION DES LECITHINES

1) PURIFICATION DE LA LECITHINE DU JAUNE D'OEUF

Les jaunes d'oeuf sont mis en suspension avec de l'acétone anhydre. Le résidu est séché sous vide puis repris par de l'alcool absolu. La lécithine est purifiée par passage sur une colonne d'alumine. Elle est analysée en phosphore et en azote. Le rapport $\frac{P}{N} = 0,96$. Sa composition en acides gras est déterminée quantitativement

par chromatographie gazeuse après saponification et méthylation par le diazométhane.

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA LECITHINE D'OEUF

C 14 : 0	traces	C 18 : 1	31,6
C 16 : 0	31,3	C 18 : 2	16,3
C 16 : 1	3	C 18 : 3	0,3
C 18 : 0	13	C 20 : 2	0,2
		C 20 : 3	3,7

2) PURIFICATION DE LA LECITHINE A PARTIR DE LA BILE HUMAINE

La lécithine est séparée des sels biliaires conjugués par un partage (43) puis purifiée par chromatographie sur colonne d'acide silicique (5).

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA LECITHINE BILIAIRE

C 14 : 0	traces	C 18 : 1	20
C 16 : 0	42,6	C 18 : 2	24,7
C 16 : 1	5	C 18 : 3	traces
C 18 : 0	5,4	C 20 : 4	2,2

C - PURIFICATION DU CHOLESTEROL

Le cholestérol est préparé à partir d'un produit commercial par trois recristallisations successives dans du méthanol anhydre. Son point de fusion déterminé par la méthode du capillaire est de 147° C.

II - ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (28)

L'appareil utilisé est un chromatographe Microteck type 2500 R, à double colonne et à double détecteur à ionisation de flamme. L'aire des pics est mesurée à l'aide d'un intégrateur digital infotronics automatique type CRS 2 connecté en parallèle sur l'enregistrement du chromatographe. Les colonnes utilisées ont deux mètres de long et 3 mm de diamètre, elles sont remplies de gaz Chrom Q 100 / 120 mésh (A.S.L.) inprégné de 1 % de silicone fluoré QF_1. L'analyse se fait en température programmée à trois gradients :

115 à 157°C à 5°C par minute pendant 10 minutes
157 à 180°C à 12,5°C " 2 minutes
180 à 230°C à 3°C "

puis isotherme à 230°C pendant 15 minutes.
L'azote est employé comme gaz vecteur avec un débit de 115 ml par minute.

La bile est saponifiée avec la soude 1,25N pendant trois heures à 120°C dans des tubes scellés, puis acidifiée par l'acide chlorhydrique. L'extraction des lipides se fait à l'éther éthylique. Les résidus secs sont ensuite méthylés par le diazométhane et soumis à la trifluoroacétylation.

Ce système présente l'avantage de pouvoir séparer en une seule analyse les acides gras (d'après la longueur de leur chaîne) le cholestérol et les acides biliaires (acides lithocholique, desoxycholique, chenodesoxycholique, cholique) (Fig 6).

La séparation des acides gras suivant leur degré d'insaturation a été effectuée sur une colonne en acier inoxydable remplie de D.E.G.S. à 25 % sur chromosorb W 80/100 mesh.
La température du four est maintenue à 185°C. Le débit du gaz Vecteur (N_2) = 60 ml.min.

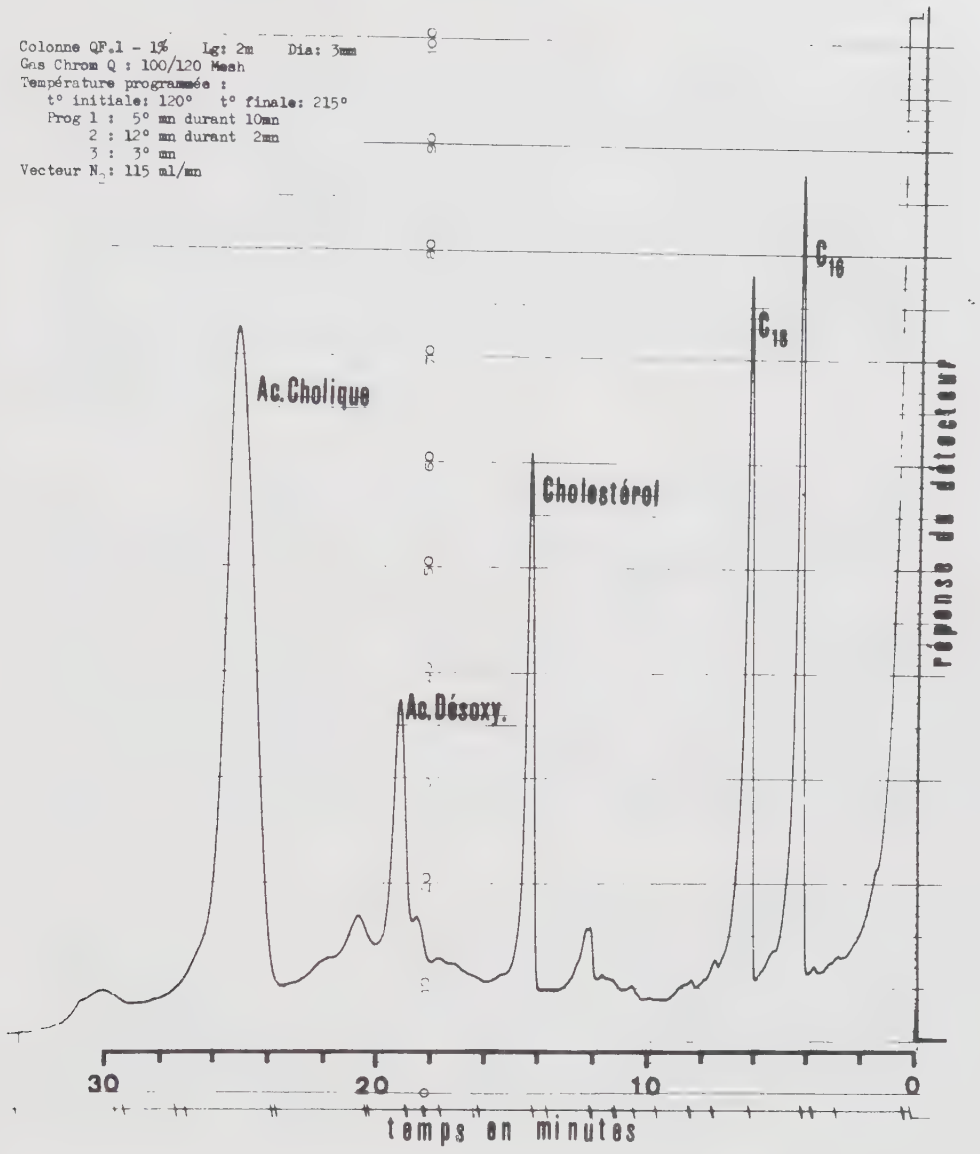


Fig. 6 : Séparation des acides gras, du cholestérol et des acides biliaires d'une bile hépatique par chromatographie en phase gazeuse.

III - DOSAGE DES SELS BILIAIRES PAR METHODE ENZYMATIQUE

Les sels biliaires totaux, libres ou conjugués, ont été dosés par une réaction enzymatique utilisant la 3 α hydroxystéroïde deshydrogénase (29, 30) en présence de NAD. Le groupement OH en 3 α d'une molécule de sel biliaire est oxydé en groupement cétone avec passage d'une molécule de N.A.D. en N.A.D.H. Le N.A.D.H. est dosé colorimétriquement à 340 nm. L'enzyme est spécifique des hydroxyles 3 α des stéroïdes des séries C_{19} C_{21} C_{24}. Le cholestérol n'est donc pas dosé par l'enzyme.

L'enzyme est dissout dans un tampon tris E.D.T.A. pH = 9,4, puis mélangé au N.A.D. (1 mg/ml dans l'eau). Une aliquate de cette solution est alors mise en présence du substrat à doser. L'étalonnage est fait avec des solutions d'acides biliaires purifiés, libres ou conjugués, dans un tampon pyrophosphate 0,1 M pH 10,4. Pour les essais, les biles hépatiques sont diluées au 1/500° et les biles vésiculaires au 1/1 000° dans le tampon. La limite de détection est de 1 μ g d'acide biliaire. La cadence de dosage est de 20 échantillons par heure. Le temps d'analyse est de 38 mm.

Pour déterminer les proportions des acides biliaires présents dans les échantillons de bile, nous avons séparé par chromatographie sur plaque, les 4 groupes de sels biliaires conjugués. (taurocholique - le taurodihydroxycholanique - glycocholique - glycodihydroxycholonique). La migration est effectuée sur plaque de gel de silice ; trois systèmes de phase ont été utilisés :

- butanol - acide acétique - acétate d'éthyle (50 - 10 - 40)
- butanol - acide acétique - eau (100 - 10 - 10)
- toluène - acide acétique - eau (10 - 10 - 1)

Les plaques sont grattées, les sels biliaires élués et chaque groupe est analysé quantitativement par la méthode enzymatique.

IV - DOSAGE DU PHOSPHORE DE LA BILE

Une méthode automatique de dosage du phosphore a été mise au point

au laboratoire (31). Les échantillons de bile sont d'abord minéralisés puis dosés colorimétriquement au moyen d'une chaîne automatique.

1) TECHNIQUE DE MINERALISATION

Au résidu sec de 50 μl de bile, on ajoute 1 ml d'acide perchlorique à 60 % (9,5N). On chauffe alors environ pendant 15 mn au bain de sable à 250°C jusqu'à éclaircissement. On ajoute 4 ml d'eau. Le phosphore se trouve ainsi à l'état d'ion PO_4^{3-} dans l'acide perchlorique 2N.

2) ANALYSE AUTOMATIQUE DES PHOSPHATES

Elle se fait à l'aide d'une chaîne Technicon constituée d'un préleveur automatique d'échantillon, d'une pompe péristaltique, d'un bain marie maintenu à 60°, d'un colorimètre et d'un enregistreur avec échelle logarithmique (Fig 7). L'étalonnage s'effectue avec des solutions de PO_4H_2K dans l'acide perchlorique 2N entre 0,0005 g/1 et 0,005 g/1 de phosphore. L'échantillon est pompé, mélangé à la solution acide de molybdate d'ammonium puis passe dans une bobine de mélange. Le phosphomolybdate obtenu est alors réduit par le chlorure d'étain. Ce réducteur donne une sensibilité bien plus grande que l'ANSA utilisé classiquement. La couleur bleue est révélée dans le bain marie et la densité optique est lue à 660 nm. Par cette méthode, 40 échantillons peuvent être dosés en une heure sans qu'aucune pollution n'intervienne. La réaction utilisée est spécifique des ions orthophosphate, seuls l'arsenic et l'antimoine réagissent dans les mêmes conditions, mais il est peu propable de rencontrer de tels composés dans la bile. Le limite de détection est de 0,1μg de phosphore. Le temps de dosage est de 4 minutes.

La quantité d'ions orthophosphates libres dans la bile hépatique humaine est très faible (10 mg / l) par rapport à la quantité de phospholipides présents dans la bile (entre 5 et 10 g/l).

Cette méthode d'analyse nous a été particulièrement utile dans la déter-

mination du pourcentage des différents phospholipides biliaires après séparation sur colonne d'acide silicique.

V - DIFFRACTION DES RAYONS X

Les échantillons étaient préparés et équilibrés durant 24 heures à 25° C avant d'être examinés par diffraction aux rayons X. Les mesures ont été effectuées sur un appareil Beaudoin. Le tube à rayons X possède une anticathode en cuivre et fonctionne sous une tension de 40 KV et avec un débit de 10 mA. La radiation Kα a été sélectionnée. Une chambre droite et une chambre circulaire ont été utilisées pour déterminer respectivement les grands espacements (de l'ordre de plusieurs dizaines d'$\mathring{A}$) et les petits espacements (de l'ordre de 5 $\mathring{A}$). Chaque échantillon est exposé aux rayons X pendant 24 heures à des températures de 24 - 25° C.

L'extrait sec des mélanges étudiés était déterminé avant et après l'exposition aux rayons X.

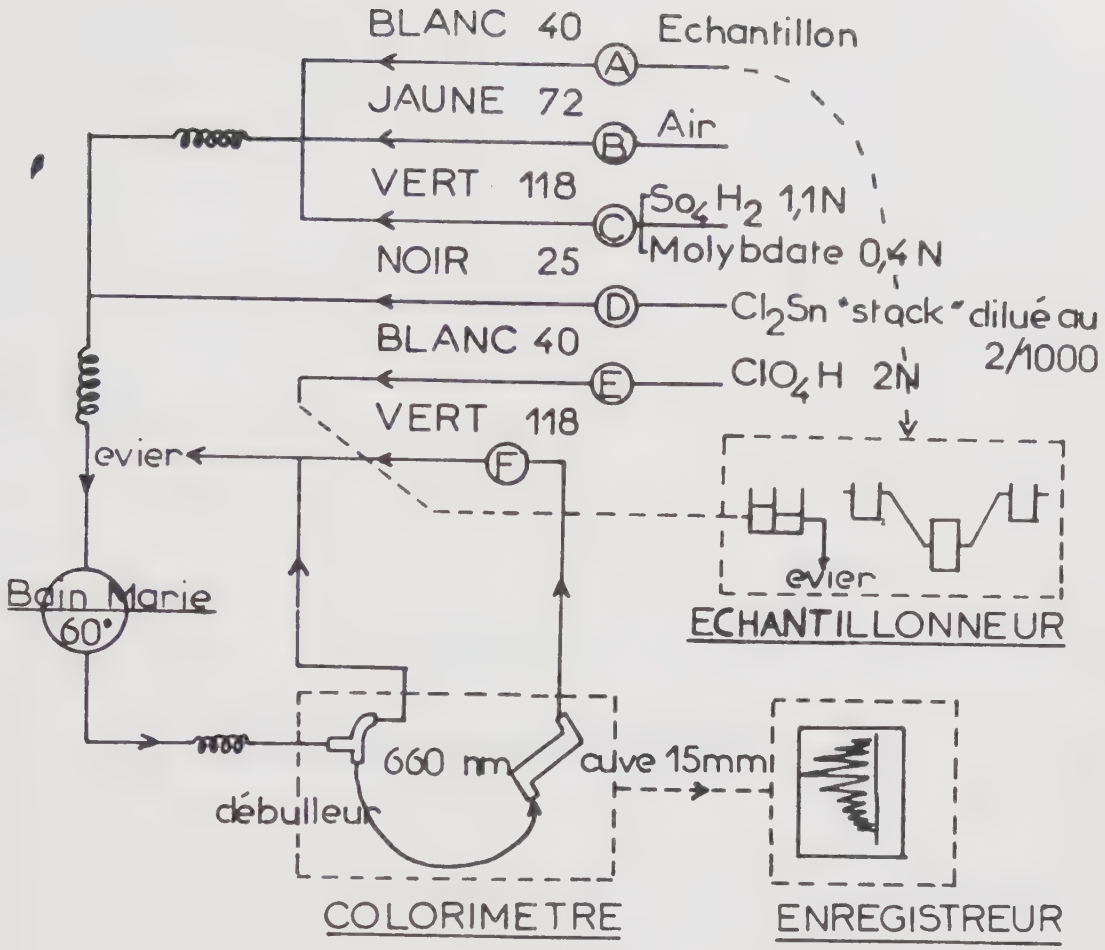


Fig. 7 : Analyse automatique des phosphates.

Troisième chapitre

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Le but de notre travail est de mieux connaître le comportement des lipides biliaires en phase aqueuse.

Notre étude a porté essentiellement sur les phospholipides. Il convenait tout d'abord de les isoler des autres lipides, et d'étudier leur nature (type de phospholipides, nature des acides gras).

Leur structure dans l'eau a été définie à l'aide de la microscopie polarisante et des rayons X.

Enfin les types d'association de la lécithine avec d'autres lipides ont été envisagés : En particulier, l'étude de l'incorporation du cholestérol dans une phase paracristalline et la solubilisation du cholestérol dans les micelles mixtes lécithines-sels biliaires.

La compréhension des mécanismes de dissolution du cholestérol en phase aqueuse peut aider à résoudre un problème biologique important : celui de la lithiase biliaire cholestérolique.

I - ETUDE DES COMPOSES PHOSPHORES DE LA BILE

Les données de la littérature concernant les quantités relatives du phosphore minéral et du phosphore organique dans la bile humaine sont peu nombreuses et souvent divergentes(44,45).D'autre part il est très important de connaître la nature des différents phospholipides biliaires. Nous avons abordé successivement ces deux problèmes.

1) ETUDE DU PHOSPHORE MINERAL DES BILES HUMAINES

Le phosphore minéral est représenté exclusivement par les ions orthophosphates. Pour séparer le phosphore minéral du phosphore organique, plusieurs méthodes ont été envisagées.

a) PRECIPITATION DU PHOSPHORE ORGANIQUE PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE DILUE(46).

Un ml. de bile est déposé dans un tube à centrifuger puis additionné de 5 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,1 N. Après centrifugation de 15 minutes à 15 000 tours/mn le surnageant est recueilli. Les composés phosphorés de ce surnageant sont appelés P_{HCl}. Le culot de centrifugation qui contient les phospholipides est solubilisé par l'acide acétique. Ce phosphore est appelé P_{AcOH}. Neuf échantillons de bile hépatique de drainage ont été traités dans les heures qui suivaient le prélèvement. Le P_{HCl} et le P_{AcOH} ont été dosés.

Les valeurs du P_{HCl} sont en moyenne de 20 mg/l de P. Les valeurs du P_{AcOH} sont beaucoup plus élevées et en moyenne égales à 70 mg par litre de phosphore.

Par cette méthode le rapport $\frac{\text{P organique}}{\text{P minéral}}$ ne peut pas être connu de façon suffisamment précise, car il est très difficile de ne pas entraîner dans le P_{HCl} des traces de phosphore organique. Ainsi les valeurs de P_{HCl} sont données par excès. Deux autres techniques ont confirmé cette observation.

b) EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES PAR LE CHLOROFORME-METHANOL

Les phospholipides sont extraits à partir de la bile selon la méthode de Folch (43) par un mélange chloroforme-méthanol (2-1). Entre 90 % et 95 % du phosphore total est entraîné dans la phase chloroformique. Le phosphore minéral obtenu par différence représente donc au maximum 10 % du phosphore total.

c) DOSAGE DE L'ORTHOPHOSPHATE PAR DIALYSE

Cette technique (47) fait appel à un dialyseur à flux continu que l'on branche au départ d'une chaîne d'analyse d'orthophosphate. Les échantillons de bile sont dilués préalablement dans l'eau. Seuls les ions orthophosphates dialysent, passent dans le flux accepteur et sont dosés par la chaîne automatique. Les phospholipides restent dans le flux donneur et sont éliminés du circuit. Dix biles hépatiques humaines fraîches ont été ainsi traitées. Le phosphore dialysable est en moyenne égal à 9,8 mg de P par litre. Le phosphore total étant de 105,5 mg de P/litre.

De tels résultats confirment la prépondérance du phosphore organique ($>$ 90 %) par rapport au phosphore minéral. De plus ces valeurs ont été obtenues à partir de biles de long drainage donc appauvries considérablement en phospholipides.

2) ETUDE DU PHOSPHORE ORGANIQUE

Les phospholipides jouent un rôle très important dans la solubilisation micellaire du cholestérol biliaire. Cette aptitude à former des micelles mixtes, avec les sels biliaires et le cholestérol, varie suivant la nature du phospholipide envisagé. Ainsi en présence d'une même quantité de sel biliaire les lécithines sont capables de dissoudre beaucoup plus de cholestérol que ne le font les lysolécithines. L'hydrolyse de la lécithine par la phospholipase A peut d'ailleurs se produire in vivo (48) et être une cause possible de formation des calculs. Une réabsorption vésiculaire des acides gras libérés est toutefois indispensable.

Nous nous sommes proposés de séparer et de doser les différents phospholipides biliaires. Dans ce but nous avons mis au point une méthode rapide de

séparation de ces composés sur colonne d'acide silicique et sous haute pression. La méthode utilisée réside dans une relative rapidité n'empêchant pas une résolution satisfaisante. En particulier les phosphatidyl-cholines, les sphingomyélines et les lysophosphatidyl-cholines sont correctement séparées. En opérant à des pressions de l'ordre de 20 à 30 Kg/cm2 les principaux types de phospholipides peuvent être séparés en un laps de temps de 3 à 8 heures. Les résultats obtenus, avec des quantités d'acide silicique inférieures à celles habituellement utilisées, montrent qu'un débit constant sous haute pression appliqué sur des colonnes de faible section ne semble pas altérer la résolution chromatographique.

A - MATERIEL ET METHODE

Le matériel utilisé est explicité par la figure 1.

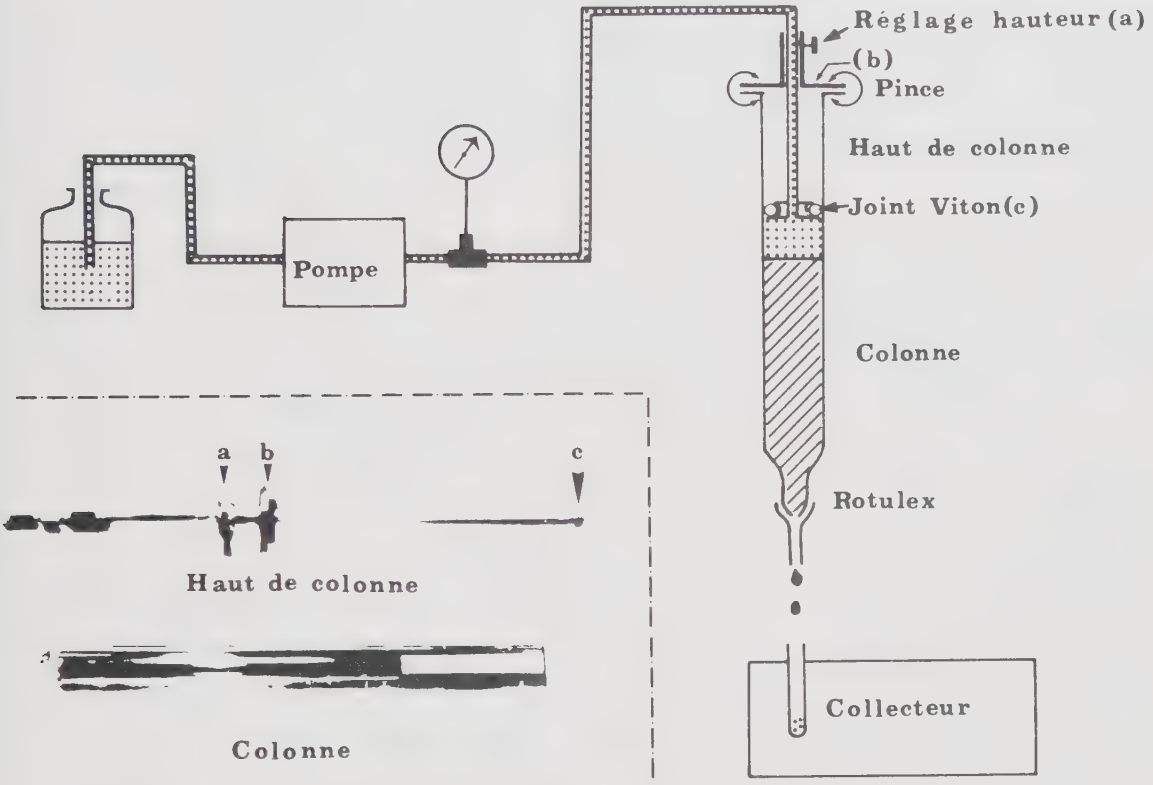


Fig. 1 - Système de chromatographie sous haute pression.

- pompe doseuse
- colonne de verre : 50 cm de hauteur, 6 mm de diamètre intérieur
- support. Acide silicique 100 mesh Mallinckrodt (4g) comportant 50 % en poids de célite.
- volume des fractions recueillies : 1,4 ml d'éluant par gramme d'acide silicique.

PROGRAMME D'ELUTION

Le tableau I schématise deux programmes. Pour le programme A nous nous sommes inspirés de la technique de PHILIPS (32), mais la fin du programme est modifiée afin de limiter l'élution en trainée des sphingomyelines. Le deuxième programme (programme B) permet de conserver un débit élevé et constant durant toute l'élution chromatographique. Le programme A que nous avons utilisé pour la séparation des phospholipides de la bile, nécessite par contre une diminution du débit en cours de chromatographie, l'enrichissement important en eau déterminant une augmentation de la pression.

Tableau I

PHASE	DEBIT : ml : mn	NOMBRE DE FRACTION (1,4 ml/g acide silicique)	COMPOSES ELUES
PROGRAMME A			
C/M 90/10	1	5 à 10	Lipides neutres Acides phosphatidiques (AP)
C/M 80/20	1	12 à 15	Cephalines (PE+PS)
C/M/W 80/20/1,35	1	13 à 15	Phosphatidylcholines (PC)
E/W 93/7	0,5	12 à 15	Sphingomyelines (Sph)
E/W 80/20	0,5	10	Lysophosphatidyl Cholines (LPC)
PROGRAMME B			
C/M 90/10	1,75	5 à 10	Lipides neutres Phosphatidiques acides
C/M 80/20	1,75	10 à 15	Cephalines
C M/W 80/20/1,35	1,75	30 à 35	Phosphatidylcholines Sphingomyelines
C/M/W 80/20/4	1,75	10	Lysophosphatidyl Cholines

C Chloroforme M Méthanol E Ethanol

ANALYSE DES COLLECTIONS DE FRACTIONS

1°) L'analyse qualitative a été effectuée par chromatographie en couche mince (Kieselgel HR Mercks) avec les systèmes de phases suivants :

- Chloroforme - méthanol - eau 65-25-4 (v/v) selon Skipski (33)
- Choroforme - méthanol - acide acétique - eau 60-30-8-4 selon Brockmann et Gercken (34)
- Choroforme - méthanol - ammoniaque à 25 % 70-30-5 selon Siakotos et Rouser (35)

La révélation a été effectuée par le réactif au bleu de molybdène selon Dittmer et Lester (36) et par la ninhydrine pour caractérisation des phosphatidylserines. L'évaporation des prélèvements a été effectuée sous courant d'azote à 37° C.

2°) L'analyse quantitative a été effectuée par la technique semi automatique que nous avons mise au point au laboratoire (31) permettant de traiter de 30 à 40 collections de fractions par heure.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1°) Séparation de phospholipides étalons

Le tableau I schématise deux programmes d'élution et la séparation des divers types de phospholipides qui a été obtenue. La figure 2 montre la séparation entre phosphatidylcholines, spingomyelines et lysophosphatidylcholines. La séparation obtenue est satisfaisante malgré la quantité faible d'acide silicique utilisée. L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince avec les trois systèmes de phase décrits montre l'absence d'une intercontamination appréciable entre les phospholipides séparés.

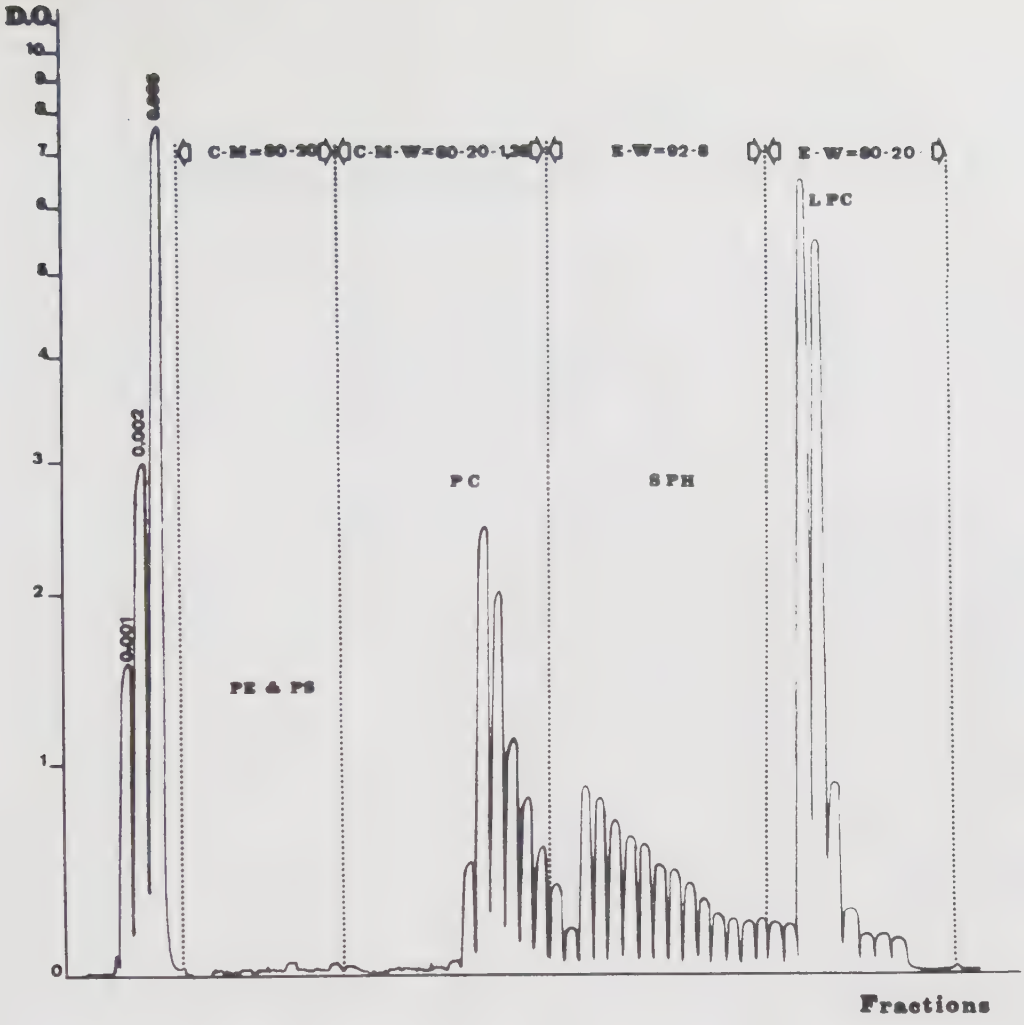


Fig 2 - Séparation entre phosphatidylcholines, sphingomyelines et lysophosphatidylcholines

2°) Séparation des phospholipides de la bile humaine

Les travaux de Johnston (37), d'Isaksson (49) de Polonovski et Bourillon (38) et de Borgstrom (39) suggéraient que les phosphatidylcholines étaient les seuls phospholipides de la bile humaine. En 1961, Nakayama et Blomstrand (40) après chromatographie sur papier et activation neutronique concluent que les phosphatidylcholines représentent plus de 80 % des phospholipides de la bile humaine. Ces auteurs rapportent la présence de phosphatidylserines, de phosphatidylethanolamines, de cholines plasmalogenes, de phosphatidylinositols et de lysophosphatidylcholines. Turner en 1962 (41) signale la présence d'acides phosphatidiques qui représenteraient 3 % des phospholipides.

Nous avons étudié 6 biles vésiculaires humaines et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau II.

Tableau II

Analyse quantitative des divers phospholipides de six biles humaines prélevées par ponction per-opératoire.

(Programme A)

Biles vésiculaires	AP	PE	PC	SPH	LPC
n° 1	ND	ND	96,5 %	ND	3,5 %
n° 2	ND	ND	94 %	ND	6 %
n° 3	ND	1,7 %	96,2 %	ND	2,1 %
n° 4	ND	0,7 %	97,6 %	ND	1,7 %
n° 5	ND	1 %	94,8 %	ND	4,2 %
n° 6	ND	1,5 %	97,7 %	ND	0,8 %
m , $\pm$ Sm	0	0,8 $\pm$ 0,3 %	96,1 $\pm$ 0,6 %	0	3,0 $\pm$ 0,8 %

La figure 3 représente un exemple de séparation des phospholipides d'une bile vésiculaire humaine.

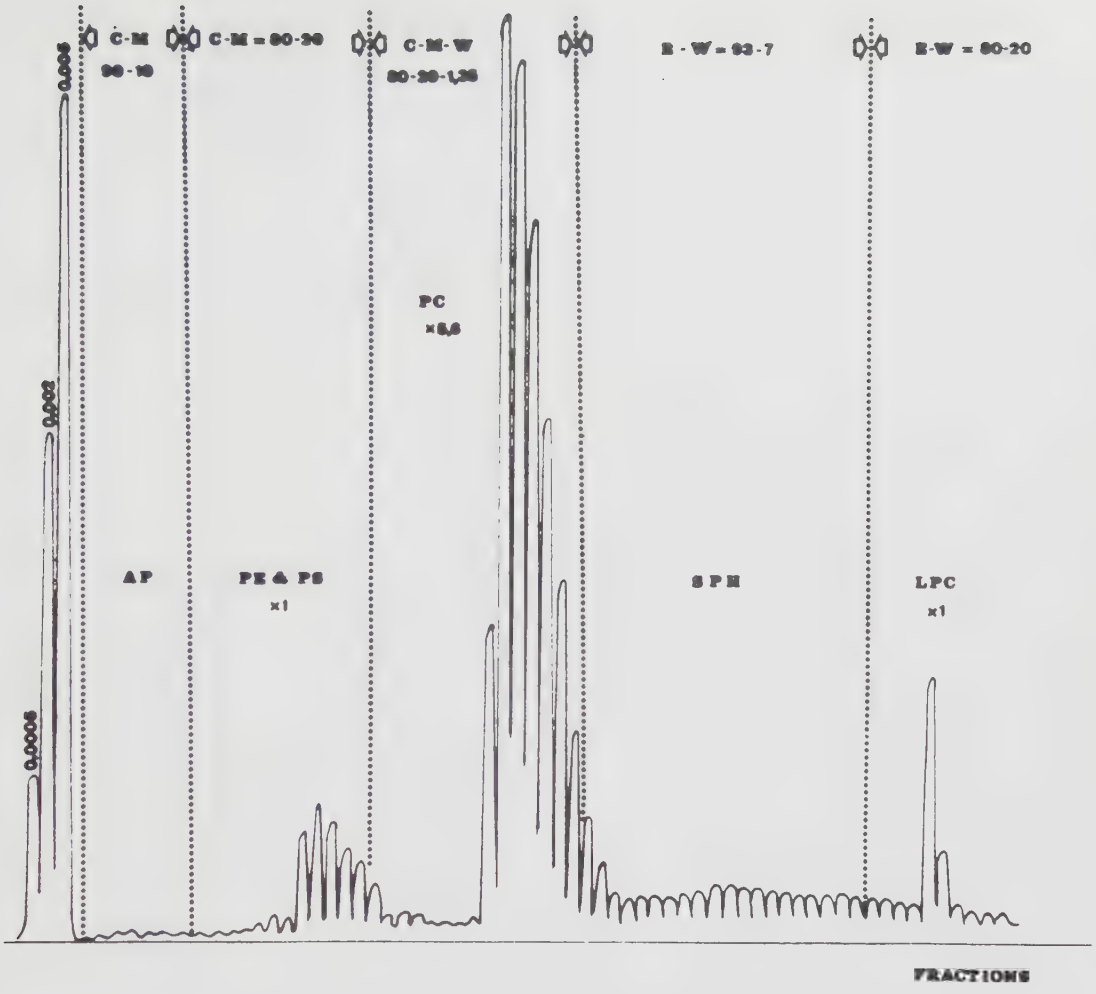


Fig 3 - Séparation des phospholipides d'une bile vésiculaire humaine

A partir des résultats figurant dans le tableau II, nous pouvons conclure :

- les phosphatidylcholines prédominent largement dans la bile humaine.
- les lysophosphatidylcholines et les céphalines sont présents en faible quantité. Parmi les céphalines seules les phosphatidyléthanolamines ont été caractérisées par chromatographie en couche mince, alors que les phosphatidylserines sont indétectables ce qui confirme les constatations de Spitzer (42).

- Les autres phospholipides ne peuvent se trouver dans la bile humaine qu'à l'état de traces. En particulier nous n'avons pas trouvé d'acides phosphatidiques signalés par Turner (41) ni de sphingomyéline (40).

Dans la suite de nos expériences nous avons réalisé des biles artificielles. La lécithine a été le seul phospholipide utilisé.

3°) Purification des lécithines à partir de la bile humaine

La bile a été prélevée chez des patients porteurs d'un drain en T placé dans la voie biliaire principale. Les lipides biliaires sont séparés des sels biliaires conjugués par un partage suivant la méthode de Folch (43) . De la bile est mélangée avec du chloroforme-méthanol 2.1 (V/V). Le mélange est chauffé pour assurer le précipitation des protéines. Après refroidissement la solution est filtrée, puis mise en partage avec de l'eau. La totalité des phospholipides se retrouve dans la phase inférieure chloroformique. Les lécithines sont ultérieurement purifiées par chromatographie préparative sur colonne d'acide silicique. Les phosphatidylcholines sont éluées par le mélange chloroforme-méthanol 60/40. Les lécithines obtenues sont chromatographiquement pures. Elles sont stockées sous forme de solution alcoolique en présence d'un antioxydant.

Leur composition en acides gras obtenue par chromatographie gazeuse après saponification et méthylation par le diazométhane est décrite plus haut. Il est à noter que cette composition est assez différente de celle des lécithines extraites du jaune d'œuf. En particulier les lécithines biliaires sont plus riches en acides palmitique et linoléique, mais contiennent une plus faible proportion d'acides stéarique et oléique.

II - ETUDE DE LA TEXTURE ET DE LA STRUCTURE DE LA LECITHINE BILIAIRE DANS L'EAU

I - TEXTURE

L'étude, au microscope polarisant, d'échantillons de lécithines biliaires, effectuée à la température ambiante, montre une texture semblable à celle de la phase dite "lisse" des savons (Fig 4).

On sait que la lécithine gonfle dans l'eau en donnant un cristal liquide lamellaire. Cette organisation en feuillets peut être observée au microscope. Les couches de lipides s'écoulent et glissent les unes sur les autres spontanément ou sous l'influence d'une pression exercée sur la lamelle. Dans un excès d'eau, la lécithine donne des figures myéliniques qui sont des excroissances cylindriques de diamètre constant (Fig 5). Ces cristaux liquides sont fluides dans la direction de leur croissance mais résistent dans la direction perpendiculaire à l'axe du cylindre. Ces cylindres sont biréfringents et ne coalescent pas lorsqu'ils sont en contact l'un avec l'autre.

2 - STRUCTURE

Les rayons X donnent des renseignements sur la structure des phases. L'analyse par diffraction aux rayons X de lécithine extraite de la bile montre les espacements caractéristiques d'une structure lamellaire. Elle permet aussi de mettre en évidence le phénomène du gonflement.

ETUDE DES MELANGES LECITHINES BILIAIRES-EAU A DIFFERENTS POURCENTAGES D'EAU

a) ETUDE DES GRANDS ESPACEMENTS

Connaissant le grand espacement "d" et la proportion de lipides et d'eau

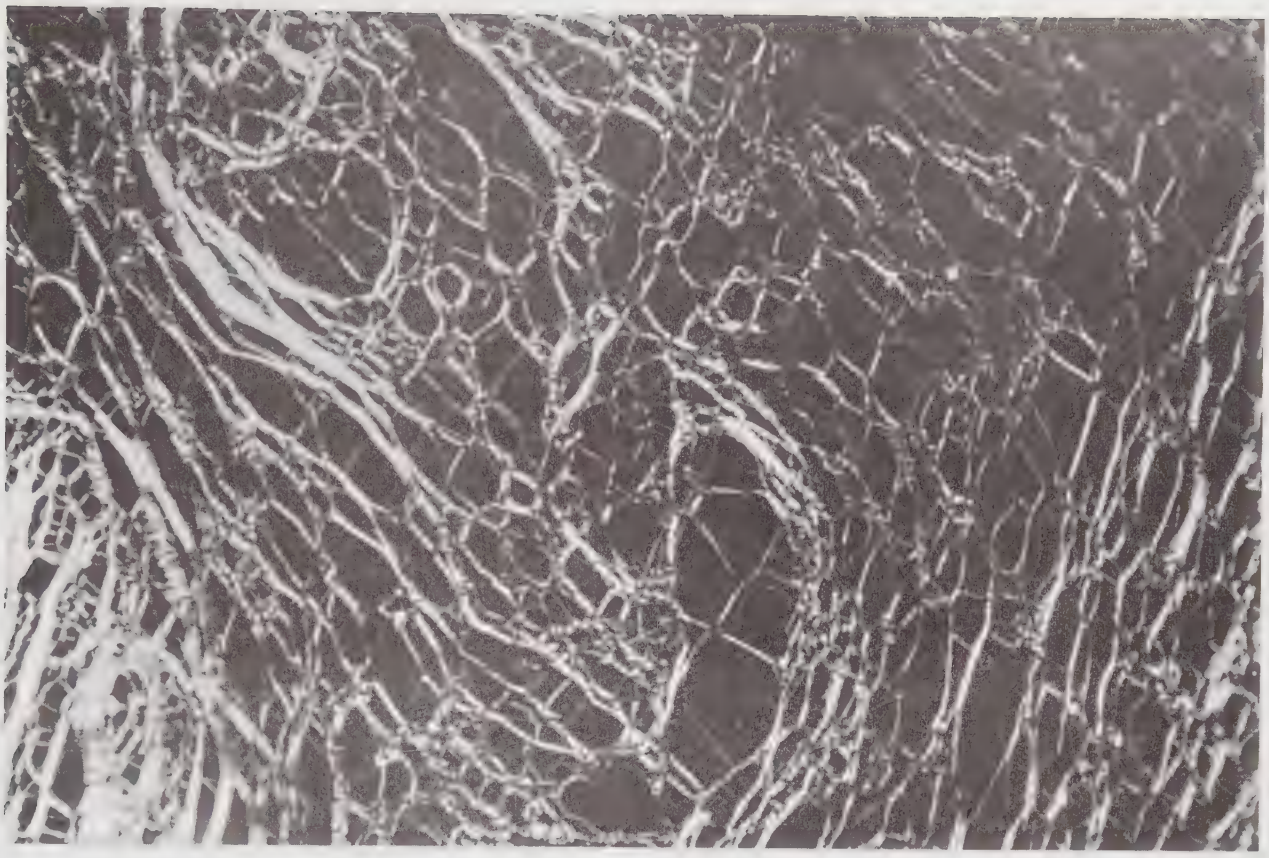


Fig. 4 - Lécithines biliaires - Eau (82-18)

Aspect "lisse" classique

Fig. 5 - Lisse saturé d'eau - Figures myéliniques

en présence il nous est possible de calculer un certain nombre de paramètres cristallographiques qui permettent de mieux comprendre les propriétés physiques de la lécithine dans l'eau. Dans la structure lamellaire, la lécithine qui possède 2 groupements polaires forts place la partie phosphorylcholine de sa molécule dans la couche d'eau. La longueur de ce groupement étiré au maximum a été évaluée à 8 $\mathring{A}$. Une certaine quantité d'eau se trouve autour des groupements phosphorylcholine, une autre partie constitue une couche d'eau "libre" (au delà de 8 $\mathring{A}$).

Le volume moléculaire de la lécithine (VI) peut être facilement calculé.

$$VI = \frac{1}{P} \times \frac{M}{N} \times 10^{24}$$

VI volume moléculaire de la lécithine en $\mathring{A}^3$

P masse spécifique en g/cm3 = 1,016

M masse moléculaire = 770

N nombre d'Avogadro

$$VI = 1259\ \mathring{A}^3$$

Le volume moléculaire de la phosphorylcholine (Vpc) a été évalué à : 204 $\mathring{A}^3$ (52).

Le volume moléculaire de la partie hydrocarbonée (Vhc) de la lécithine

Vhc = 1259 - 204 $\qquad$ Vhc = 1055 $\mathring{A}^3$

Les clichés (Fig. 6) obtenus aux petits angles de diffraction nous permettent de calculer le grand espacement "d". On obtient une seule distance réticulaire avec ses différents ordres (d, $\frac{d}{2}$, $\frac{d}{3}$, ...). Les paramètres peuvent alors être obenus :

- Aire moléculaire de la lécithine (S).

$$S = \frac{Vl}{\frac{d}{2} \times \frac{Cl}{1,016}}$$

Cl = fraction pondérale de lécithine.

- Epaisseur de la couche lipidique (dl)

$$dl = 2 \times \frac{Vhc}{S}$$

- Epaisseur de la couche d'eau (dw)

$$dw = d - dl$$

- Epaisseur de la couche d'eau "libre" (d'w)

$$d'w = dw - 16 \text{ Å}$$

Les caractéristiques de 2 mélanges lécithine biliaire -eau (à 24°C) sont présentées dans le tableau suivant :

Cw	Cl	d	S	dl	dw	d'w
0,18	0,82	51,5 Å	60,7 Å^2	34,8 Å	16,7 Å	0,7 Å
0,31 5	0,68 5	57 Å	65,4 Å^2	32,2 Å	24,8 Å	8,8 Å

Les remarques suivantes peuvent être faites :

- Dans les expériences réalisées, un seul type d'espacement a été obtenu. Ceci montre que le mélange de lécithines, malgré son hétérogénéité en acides gras, se comporte comme un composé unique ne donnant qu'une seule forme cristalline.

Quand la concentration en eau augmente :

- Le grand espacement croît.
- L'épaisseur de la couche lipidique diminue et en conséquence l'aire moléculaire augmente.
- L'épaisseur de la couche d'eau "libre" augmente de façon très nette.

Toutes ces modifications sont les conséquences du gonflement. L'eau pénètre entre les extrémités polaires des molécules de lécithines et produits une augmentation de l'épaisseur des strates.

b) ETUDE DES PETITS ESPACEMENTS.

Au lieu d'avoir plusieurs lignes d'espacements latéraux bien définis, on observe une bande diffuse dont l'espacement est voisin de 4,5 Å . Ceci met en évidence l'état liquide des chaînes hydrocarbonées de la lécithine.

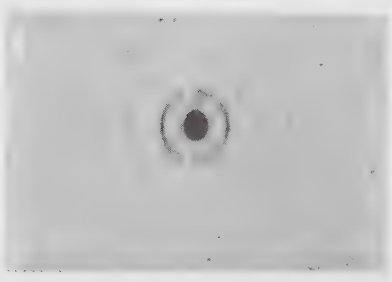


Fig. 6 - Cliché de diffraction de rayons X d'une phase lamellaire

III - INCORPORATION DU CHOLESTEROL DANS LA STRUCTURE LAMELLAIRE DE LA LECITHINE DE BILE HUMAINE

L'incorporation du cholestérol dans la structure lamellaire de la lécithine a été suivie au microscope polarisant. Cette technique a été préférée à celle utilisant la diffraction des rayons X car elle permet de mieux déceler la présence d'une phase minoritaire dans une phase majoritaire. Nous avons précisé la limite supérieure d'incorporation du cholestérol dans la phase "lisse". Au delà de cette limite deux phases sont en présence : la phase lamellaire et les cristaux biréfringents de cholestérol.

1) - METHODE

Les mélanges ont été préparés de la façon suivante :

Un poids connu de cholestérol est ajouté à un volume donné de la solution alcoolique de lécithine ; du chloroforme est ajouté pour faciliter le mélange. Le solvant est évaporé et le résidu est séché sous vide en présence d'anhydride phosphorique. La quantité d'eau requise est alors ajoutée puis les mélanges sont mis à équilibrer durant 24 heures. Avant l'observation au microscope le pourcentage d'eau exact du mélange est déterminé par extrait sec. Des quantités croissantes de cholestérol ont été ajoutées à des quantités fixes de lécithines. Le pourcentage d'eau a été choisi dans tous les cas égal à 30 % (% exprimé par rapport à la quantité totale des 3 composés), le maximum d'incorporation ayant lieu entre 25 et 35 % d'eau (19). La température de l'expérience est de 24° C.

2) - RESULTATS

Dans de telles conditions nous avons pu incorporer 32 % de cholestérol dans la phase paracristalline (% pondéral exprimé par rapport au poids de solide).

Ceci correspond approximativement à l'incorporation d'une molécule de cholestérol pour une molécule de lécithine. Dans des conditions identiques (% d'eau, température, temps d'équilibration ...) la phase lamellaire obtenue avec la lécithine extraite du jaune d'œufs incorpore 34 % de cholestérol (19). Ainsi ces deux lécithines, malgré des compositions en acides gras très distinctes, se comportent de façon identique. Nous verrons plus loin qu'une des conditions essentielles qui rend possible la solubilisation du cholestérol dans la phase lamellaire, à savoir l'état liquide des chaînes grasses, est réalisée dans les deux types de lécithines utilisées.

IV - INFLUENCE DE LA NATURE DES LECITHINES ET DES SELS BILIAIRES SUR LA SOLUBILISATION MICELLAIRE DU CHOLESTEROL.

On sait que les sels biliaires à eux seuls n'entraînent que très peu la dissolution du cholestérol dans l'eau. Dans de telles conditions, le tiers seulement du cholestérol biliaire pourrait être solubilisé. Les phospholipides jouent un rôle important dans le phénomène de la solubilisation du cholestérol. La lécithine qui ne peut que gonfler dans l'eau, sans se dissoudre, est solubilisée sous forme de solution micellaire, par d'addition de sels biliaires. Ainsi, si le cholestérol ne peut pas se dissoudre dans l'eau, il peut en s'associant avec la lécithine être entraîné dans les micelles mixtes par l'addition de sels biliaires. La solubilisation du cholestérol dans la bile apparaît ainsi liée à un certain équilibre entre les proportions respectives des trois amphiphiles en présence.

Il nous a semblé intéressant de tester les limites de la zone de solubilisation micellaire dans les conditions les plus proches de celles du milieu biliaire. Les solubilisations ont été obtenues en utilisant la lécithine et le mélange des sels biliaires conjugués extraits de la bile humaine. (53).

1) - PREPARATION DES MELANGES

Des solutions des 3 produits étudiés ont été préparées dans le méthanol et leurs concentrations déterminées par extraits secs. En prélevant des volumes en proportion convenable de ces solutions, on prépare d'abord différents mélanges binaires de lécithine et de sels biliaires. A partir de chacun de ces mélanges, on prépare des séries de mélanges ternaires contenant des quantités croissantes de cholestérol. Après évaporation complète de l'alcool, un échantillon de chacun de ces mélanges ternaires est additionné d'une quantité d'eau (tampon phosphate 0,05 M Ph 7,0) telle que, le mélange final contienne toujours 10 % en poids de solide total, conditions proches de la bile vésiculaire humaine. Les tubes sont scellés sous azote puis agités pendant 24 heures à 37° C.

On laisse les mélanges s'équilibrer pendant 48 heures, chaque mélange est alors examiné au microscope en lumière normale et en lumière polarisée. En comparant les tubes qui contiennent des quantités croissantes de cholestérol, on peut ainsi apprécier les limites de solubilisation pour chaque proportion relative de lécithine et de sels biliaires.

Les proportions de lécithine dans le mélange lécithine - sels biliaires ont été échelonnées entre 0 et 40 % (moles %) de manière à couvrir largement le domaine des concentrations trouvées dans la bile humaine.

2) - RESULTATS

LIMITES DE SOLUBILISATION DU CHOLESTEROL PAR LE MELANGE DES SELS BILIAIRES CONJUGUES ET DES LECITHINES BILIAIRES (BILE HUMAINE) - (Résultats exprimés en mole %).

Sels biliaires	Lécithine	Cholestérol solubilisé
97,1	0	2,9
88,2	6,4	5,4
77	14,3	8,7
74,7	16,4	8,9
70,4	20,2	9,4
62,8	26,9	10,3
57,5	33	9,5
54,5	36,3	9,2

En l'absence de lécithine, 97,1 molécules de sels biliaires sont nécessaires pour dissoudre 2,9 molécules de cholestérol.

L'incorporation de cholestérol est maximum pour un rapport molaire

$$\frac{\text{sels biliaires}}{\text{lécithine}} = \frac{7}{3}$$

Au delà de la zone micellaire ainsi déterminée, le cholestérol en excès se présente sous deux formes : pour des rapports $\frac{\text{lécithine}}{\text{sels biliaires}}$ faibles, il y a apparition de cristaux de cholestérol flottant dans la solution isotrope ;

pour des rapports $\frac{\text{lécithine}}{\text{sels biliaires}}$ élevés, le cholestérol est inclus dans une phase paracristalline.

3) - DISCUSSION

- Influence de la nature des sels biliaires

La même série d'expériences a été réalisée avec des sels biliaires conjugués de la bile de bœuf. Des résultats identiques ont été obtenus.

La composition moyenne du mélange des sels biliaires de la bile humaine diffère sensiblement de celle de la bile de bœuf.

COMPOSITION DES SELS BILIAIRES DE LA BILE HUMAINE

– Taurocholate de sodium	12 %
– Taurodesoxycholate – Taurochenodesoxycholate	14 %
– Glycocholate	35 %
– Glycodesoxycholate – Glycochenodesoxycholate	39 %

Le rapport $\frac{\text{chenodesoxy}}{\text{desoxy}} = \frac{3}{1}$

COMPOSITION DES SELS BILIAIRES DE LA BILE DE BOEUF

– Taurocholate de sodium	40 %
– Taurodesoxycholate	21 %
– Glycocholate	25 %
– Glycodesoxycholate	14 %
– Cholate libre	traces

On notera un rapport $\frac{\text{tauroconjugués}}{\text{glycoconjugués}}$ beaucoup plus élevé chez le bœuf que chez l'homme. D'autre part, la bile de bœuf ne possède pas de dérivés chenodesoxy.

Nous pouvons donc conclure qu'en ce qui concerne les sels biliaires leur nature chimique n'a pratiquement aucune influence sur la capacité de dissoudre le cholestérol en présence de lécithine. Sur ce point, Neiderhiser et Admirand et Small (54,55) étaient arrivés à la même conclusion. En l'absence de lécithine les différents sels biliaires ont à l'égard du cholestérol un pouvoir de solubilisation variable, mais ces différences diminuent quand la concentration en lécithine croît et finissent par s'annuler.

- Influence de la nature des lécithines

En ce qui concerne l'influence de la nature des acides gras des lécithines, il apparaît qu'il n'y a plus de différence importante entre le pouvoir solubilisant des lécithines extraites de la bile humaine et de celles extraites du jaune d'œuf. C'est ce qui apparaît sur la figure 7 où sont comparés les résultats du présent travail avec ceux obtenus par Small qui avait déterminé les limites de solubilisation du cholestérol en présence de lécithine d'œuf. (55)

Ainsi ces deux lécithines naturelles, bien qu'ayant des profils en acides gras très distincts, assurent une incorporation équivalente du cholestérol au sein des micelles mixtes. Ce dernier résultat peut facilement s'expliquer en invoquant le mécanisme d'association du cholestérol avec la lécithine.

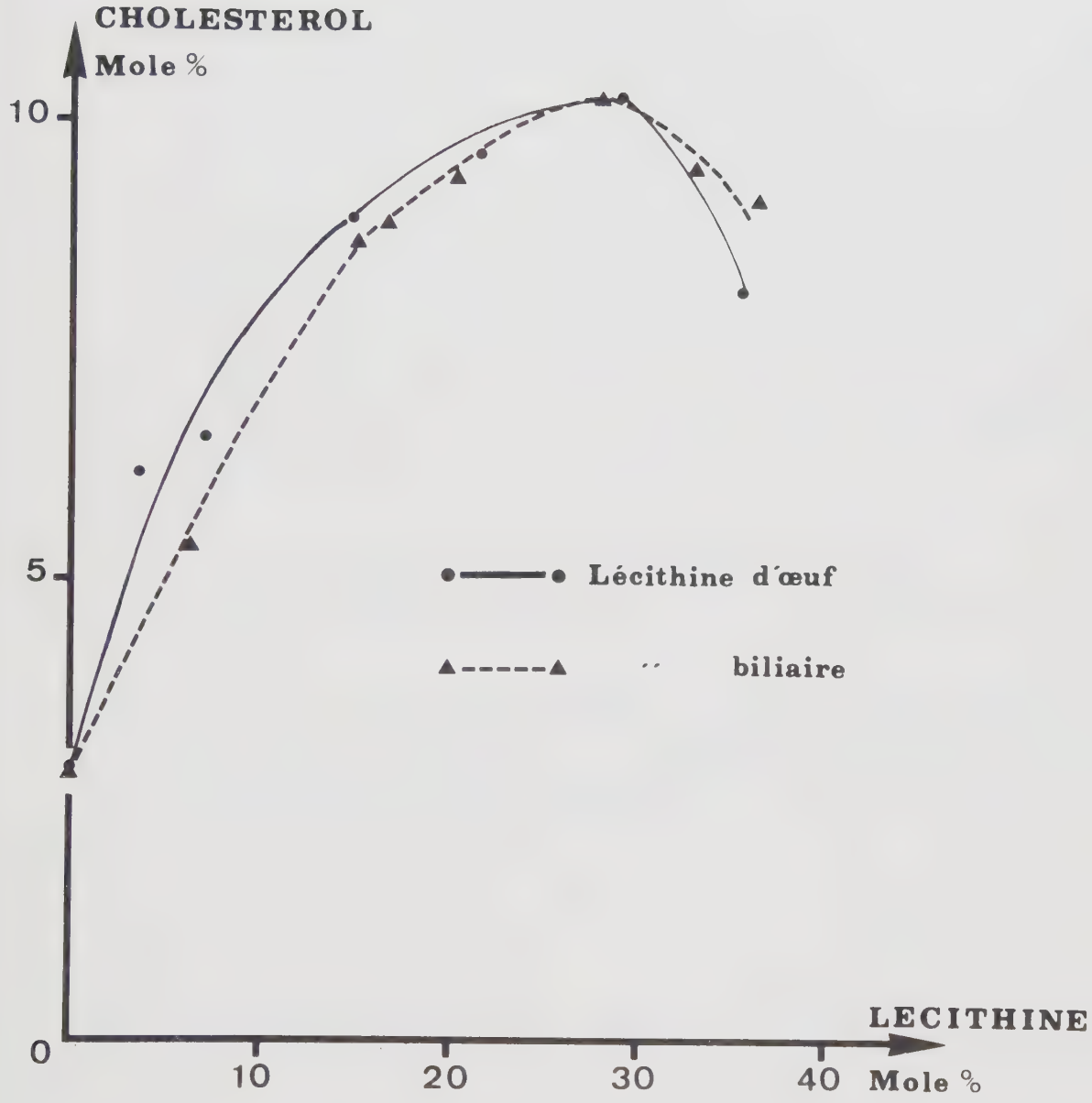


Fig. 7 - Limites de solubilisation du cholestérol en présence de sels biliaires conjugués et de lécithine

On sait que la lécithine, à elle seule, ne peut gonfler dans l'eau que si les chaînes grasses qui la constituent sont dans l'état fondu. Cette condition ne peut être réalisée à la température ordinaire ou même à 37° C avec une lécithine constituée d'acide gras à chaînes longues et saturées. Par contre, la présence, ne serait-ce qu'en partie, de chaînes insaturées abaisse la température de fusion des chaînes et permet à la lécithine de gonfler dans l'eau dès la température ordinaire. Ainsi que cela a été souligné par Dervichian l'incorporation du cholestérol dans la lécithine doit être considérée comme une véritable dissolution du noyau du cholestérol dans les chaînes paraffiniques de la lécithine. Cette dissolution exige aussi que les parties paraffiniques soient dans l'état fondu (25,26). Or, aussi bien la lécithine extraite du jaune d'œuf que celle extraite de la bile humaine, réalisent cette condition à la température ordinaire, et à plus forte raison à 37° C. Ceci s'explique par le fait que bien que les pourcentages en acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique ne soient pas les mêmes dans le détail, le pourcentage global des chaînes insaturées est à peu près le même :

55 % envison de chaînes insaturées pour la lécithine d'œuf
52 % environ de chaînes insaturées pour la lécithine biliaire

Il apparaît ainsi que seul l'état physique des chaînes conditionne l'incorporation du cholestérol et que la quantité maximum incorporée est indépendante de la composition des chaînes hydrocarbonées.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Nous avons présenté les associations que peuvent contacter entre eux trois lipides biologiquement importants que sont : la lécithine, le cholestérol et les sels biliaires. Selon les proportions des trois lipides considérés il est possible d'obtenir soit trois types de phase paracristalline soit, une phase micellaire.

La bile est un système micellaire complexe.

Les sels biliaires, dont les propriétés détergentes sont remarquables, ne sont pourtant pas capables à eux seuls de dissoudre la totalité du cholestérol biliaire. Ils peuvent par contre, très aisément, disperser, sous forme de solution micellaire, les molécules de lécithine. La lécithine parce qu'elle gonfle dans l'eau peut admettre entre ses chaînes hydrocarbonées liquides des quantités importantes de cholestérol. Les micelles mixtes sels biliaires-lécithine sont alors aptes à solubiliser dans leur "cœur" hydrocarboné liquide beaucoup plus de cholestérol que ne peuvent le faire les micelles simples de sels biliaires.

Dans ce travail nous avons identifié la nature des différents phospholipides présents dans des biles humaines. Les phosphatidylcholines représentent la quasi totalité du phosphore organique des échantillons étudiés.

Les lécithines, isolées à partir de bile humaine peuvent incorporer du cholestérol au sein d'une phase lamellaire. La quantité maximum de cholestérol solubilisé est semblable à celle obtenue avec de la lécithine du jaune d'œuf.

Nous avons examiné les limites de solubilisation in vitro du cholestérol en présence de lécithine et de sels biliaires extraits de la bile humaine. Ces conditions sont proches de celles de milieu biliaire car les 3 lipides envisagés constituent plus de 90 % du poids sec d'une bile. Les solubilisations obtenues avec des sels biliaires de différents compositions sont pratiquement identiques. D'autre part, la nature des lécithines est aussi sans influence ; seule intervient la présence d'une certaine

proportion de chaînes grasses non saturées.

Dans certaines conditions la bile est sursaturée en cholestérol. Les cristaux de cholestérol en excès peuvent être l'amorce de "calculs" qui dans la plupart des cas se développent dans la vésicule biliaire. Pour éviter la formation de tels calculs on peut tenter de modifier la composition de la bile de façon à augmenter sélectivement la concentration des éléments solubilisants du cholestérol.

L'influence de différents régimes alimentaires sur la composition des biles a été étudiée. Il semble bien établi (57) que des régimes hypercaloriques favorisent la sursaturation des biles hépatiques en cholestérol. L'administration orale de sels biliaires, en particulier celle de l'acide chenodesoxycholique, semble avoir un effet favorable. Enfin des composés tels que l'acide 3 acétyl fusidique (analogue synthétique des sels biliaires), qui ont la propriété de ne pas modifier le métabolisme du cholestérol et des sels biliaires, pourraient par leur effet détergent augmenter notablement le pouvoir dissolvant de biles lithogènes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 HARTLEY G, S Actualités Sci. Industr. 387, 1 (Hermann, Paris, 1936)

2 KRAFFT, F ; WIGLOW, H. Berichte 28 2566 (1895)

3 HAUTON J.C. ; LAURENT . B, GEROLAMI SANTANDREA, A ; GREUSARD, C ; LAFONT , H ; TESSIER , N ; SARLES , H. Clin. Chim. Acta 17 (1967) - 171 - 182

4 EKWALL, P ; MANDELL , L. Acta Chem. Scand 15 1404 (1961)

5 MONTET J.Cl ; AMIC , J ; HAUTON , J . Bull. Soc. Chim. Biol. 52 n° 7 831. (1970)

6 SAUNDERS , L ; PERRIN , J ; GAMMACK , D. J. Pharm. Pharmacol. 14 , 567 (1962)

7 HASLEWOOD , G , A , D . Bile salts (Methuen and Co. L.T.D. 1967)

8 SHINODA K, NAKAGAWA T , TAMAMUSHI B , ISEMURA T : Colloïdal Surfactants, Some Physical Chemical Properties, New York Academic Press , 1963

9 BENZONANA G. Biochim. Biophys. Acta 176 836 (1969)

10 HOFMANN A , F. Biochem. J 89 57 (1963)

11 CAREY , M ; SMALL D , M. J. Coll. Interface Science 31 n° 3 (1969)

12 HOFMANN A , F Gastroenteroloyy 48 n° 484 (1965)

13 SMALL D, M ; PENKETT S, A ; CHAPMAN D. Biochim. Biophys. Acta 176 178 (1969)

14 SMALL D, M. Advan. Chem. Ser. 84 31 (1968)

15 CORRIN M ; HARKINS W . J. Amer. Chem. Soc. 69 679 (1947)

16 BOURGES M ; SMALL D, M ; DERVICHIAN D, G. Biochim. Biophys. Acta 144 189 (1967)

17 HEGARDT F, G ; DAM H Zeitzchrift für Ernährung swissenschaft 10 223 (1971)

18 WOODFORD F J. Lipid. Res. 10 539 (1969)

19 BOURGES M ; SMALL D , M ; DERVICHIAN D , G Biochim. Biophys. Acta 137 157 (1967)

20 SMALL D , M ; BOURGES M. Mol. Crystals 1 541 (1966)

21 BERNARD L. de Bull. Soc. Chim. Biol. 40 161 (1958)

22 LECUYER H ; DERVICHIAN D , G J. Mol. Biol. 45 39 (1969)

23 SMALL D , M ; BOURGES M ; DERVICHIAN D , G. Biochim. Biophys. Acta 125 563 (1966)

24 ROSEVEAR F . J. Am. Oil. Chem. Soc. 31 628 (1954)

25 DERVICHIAN D , G. Adv. Chem. Ser. 84 A.C.S. 78 (1968)

26 Mac BAIN J' W ; HUTCHINSON E Solubilization. Academic Press N. Y. (1955)

27 HOFMANN A, F ; SMALL D , M. Ann. Rev. Med. 18 333 (1967)

28 CROTTE C ; MULE A ; PLANCHE N E Clin. Chim. Acta 27 331 (1970)

29 TALALAY P Methods Biochem. Analy. 8 119 (1960)

30 DOMINGO N ; AMIC J ; HAUTON J.C. Clin. Chim. Acta -sous presse-

31 AMIC J ; HAUTON J , C ; LAFONT H ; MONTET J.C. ; TEISSIER . N Bull. Soc. Chim. Biol. 51 n° 9 1359 (1969)

32 PHILLIPS G , B . Biochim. Biophys. Acta 41 361 (1960)

33 SKIPSKI V , P ; PETERSON R , F ; BARKLEY M. Biochem J. 374 90 (1964)

34 BROCKMANN U ; GERCKEN G Clin. Chim. Acta 23 489 (1969)

35 SIAKOTOS A , N ; ROUSER G . J. Amer. Oil. Chemist. Soc 42 913 (1965)

36 DITTMER J , C ; LESTER R , L. J. Lipid Res. 5 126 (1964)

37 JOHNSTON C , G ; IRVIN J , L ; WALTON , C . J. Biol. Chem. 131 425 (1939)

38 POLONOVSKI , M ; BOURILLON , R. Bull. Soc. Chim. Biol. 34 712 (1952)

39 BORGSTROM , B Acta Chem. Scand 11 749 (1957)

40 NAKAYAMA , F ; BLOMSTRAND . R. Acta. Chem. Scand 15 1595 (1961)

41 TURNER D, A Federation Proc. 21 25 (1962)

42 SPITZER H , L ; KYRIAKIDES E , C ; BALINT , J.A. Nature 204 288 (1964)

43 FOLCH J ; LEES M ; SLOANE-STANLEY G H. J. Biol. Chem 226 497 (1957)

44 RAVDIN I S ; JOHNSTON C G ; RIEGEL C ; WRIGHT S L, Amer. J. Physiol. 100 317 (1932)

45 TWISS R ; OPPENHEIM E Liver, Pancreas and biliary tract. Philadelpha Lea (1955)

46 AMIC J ; HAUTON J C ; LAFONT H ; MONTET J Cl ; TEISSIER N. Ann. Biol. Clin 27 3-4 177-180 (1969)

47 AMIC J ; LAIRON D ; HAUTON J C Technique de dosage de l'orthophosphate (à publier)

48 NEIDERHISER D H ; ROTH H P Gastroenterology 58 nº 1 p. 26 (1970)

49 ISAKSSON B Acta Soc. Med upsal 56 177 (1951)

50 ISAKSSON B Acta Soc. Med. Repsaliensis 59 277 (1954)

51 ISAKSSON B Acta Soc. Med. Repsaliensis 59 296 (1954)

52 SMALL D M J. Lipid. Res. 8 551 (1967)

53 MONTET J Cl ; DERVICHIAN D G Biochimie 53 nº 6-7 751 (1971)

54 NEIDERHISER D H ; ROTH H P Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128 221 (1968)

55 ADMIRAND W H ; SMALL D M The Journal of Clinical Invertigation 47 1043 (1968)

56 DERVICHIAN D G in J. Butler and H. Huxley Prog. Biophys. Mol. Biol. 14 265 (1964)

57 SARLES H ; HAUTON J ; PLANCHE N E ; LAFONT H ; GEROLAMI A. The American Journal of Digestive Diseases Vol 15 nº 3 251 (1970)

Vu et approuvé

Marseille, le Février 1972

Le Président

F. BOREL